ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. VII No 3

1 9 5 8

20 JUL 1959

PRZEPISY AUTORSKIE

Jako materiał publikacyjny mogą być nadsyłane rozprawy i komunikaty dotyczące prac oryginalnych z dziedziny mikrobiologii ogólnej, rolniczej i przemysłowej, nigdzie dotychczas nie publikowane, a referowane uprzednio na posiedzeniu Oddziału Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów lub innego towarzystwa naukowego. Czasopismo zamieszcza również referaty przeglądowe.

Jednostronne maszynopisy o podwójnych odstępach, z marginesem 4 cm należy przesyłać w 2 egz. na ręce sekretarza: Redakcja *„Acta Microbiologica Polonica"*, Wrocław, ul. Siemieńskiego 14/8.

Do prac pisanych po polsku należy dołączyć streszczenie rosyjskie, angielskie, francuskie lub niemieckie. Streszczenia powinny zawierać zasadnicze konkluzje pracy i nie powinny przekraczać 15% tekstu. Prace w obcym języku (rosyjski, angielski, francuski lub niemiecki) mogą być nadsyłane po uprzednim porozumieniu się z redakcją; należy do nich dołączyć streszczenie polskie. Każda praca powinna być zaopatrzona w tytuł w języku publikacji oraz streszczenia, nazwisko i inicjały autora (ów), nazwę i adres zakładu, w którym wykonano pracę.

Pożądany jest następujący układ prac: a) krótki wstęp, b) metody badania, c) wyniki, d) dyskusja i wnioski, e) krótkie streszczenie w języku polskim — nie więcej niż 3% tekstu, f) piśmiennictwo, g) streszczenie obcojęzyczne.

Prace należy ujmować treściwie, wstęp powinien zawierać tylko dane bezpośrednio odnoszące się do opracowanego tematu; metody należy opisać krótko: tam gdzie to możliwe powoływać się na oryginalne opisy metod.

Wyniki mogą być ilustrowane tablicami i wykresami, należy jednak unikać tablic i wykresów dla przedstawienia tych samych danych. Wykresy i tablice powinny być możliwie przejrzyste i nieskomplikowane i ilustrować zasadnicze, istotne wyniki. Rysunki i wykresy można dostarczać w czytelnych szkicach ołówkowych na brystolu, każdy na oddzielnej kartce, zaopatrzonej na odwrocie w wypisane ołówkiem: tytuł pracy, nazwisko autora oraz numer rysunku lub wykresu. Objaśnienia do rysunków i wykresów należy dołączyć na osobnej kartce z wyraźnym zaznaczeniem numeru rysunku (wykresu). W objaśnieniach należy podawać skalę lub wielokrotność powiększenia. Fotografie powinny być kontrastowe, na matowym papierze. Ilość tablic i rysunków musi być ograniczona do minimum.

W maszynopisie należy zaznaczyć miejsce, w którym ma być umieszczony rysunek (wykres, fotografia).

Przy powoływaniu się na piśmiennictwo należy podać nazwiska autorów i rok publikacji, np. Prażmowski (1879) lub (Prażmowski 1879). Jeżeli praca cytuje więcej niż jedną publikację danego autora z tego samego roku, należy to uwidocznić dodając małe litery (np. 1887 a, 1887 b itd.).

Wykaz cytowanych prac (piśmiennictwo) powinien być sporządzony w układzie alfabetycznym i powinien zawierać następujące elementy: nazwisko i inicjały autora (ów), kropka, rok, kropka, tytuł pracy, nazwa czasopisma w przyjętych skrótach, tom (ewentualnie zeszyt), stronica czasopisma; w wypadku cytowania książki: nazwisko i inicjały autora (ów), rok wydania, tytuł książki, wydanie, miejsce i wydawca, ewentualnie stronica tekstu.

W tekście i tablicach należy stosować przyjęte skróty, np. ml — a nie ccm, g — a nie gr, 100° — a nie 100°C, M — molarny, N — normalny itd.

Przy opisie roztworów należy rozróżnić „%" — g na 100 g roztworu, „% objętościowy" — ml na 100 ml roztworu, „stężenie procentowe" — g na 100 ml rozpuszczalnika.

Nazwy drobnoustrojów należy podawać w brzmieniu łacińskim, przy pierwszym wzmiankowaniu — w pełnym brzmieniu. Dopuszczalne jest również jednoczesne podawanie przyjętych ogólnie nazw polskich. W dalszym tekście nazwy rodzajowe (nie gatunkowe) należy skracać lub podawać tylko nazwy polskie.

Autor otrzymuje 25 odbitek bezpłatnie; o dodatkowe odbitki autor może zwrócić się do redakcji przy składaniu maszynopisu.

Członkowie Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów otrzymują „Acta" bezpłatnie, po przekazaniu dodatkowej składki rocznej w wysokości 70,— zł do Sekcji Mikrobiologii Ogólnej PTM (adres: Redakcja *„Acta Microbiologica Polonica"*, Wrocław, ul. Siemieńskiego 14, m. 8).

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW
SEKCJA MIKROBIOLOGII OGÓLNEJ, ROLNICZEJ I PRZEMYSŁOWEJ

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. VII No 3

1958
PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: Jadwiga Ziemięcka, członek rzeczywisty PAN — Lublin, Kazimierz Bassalik, członek rzeczywisty PAN — Warszawa, Józef Heller, członek-korespondent PAN — Warszawa, Jadwiga Jakubowska — Łódź, Aniela Kozłowska — Kraków, Władysław Kunicki-Goldfinger — Wrocław, Eugeniusz Pijanowski, członek-korespondent PAN — Warszawa, Feliks Przesmycki — Warszawa

KOMITET REDAKCYJNY

Redaktor naczelny — Władysław Kunicki-Goldfinger
Dział ogólny — Z. Lorkiewicz, Lublin
Dział rolny — J. Gołębiowska, Poznań
Dział przemysłowy — J. Jakubowska, Łódź

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE – WROCŁAW 1959

Nakład 1115+125 egz.	*Oddano do skład. 16. VIII. 1958 r.*
Ark. wyd. 4,75, druk. 4,50	*Podpisano do druku 9. II. 1959 r.*
Pap. druk. sat. kl. III, 80 g+kreda 90 g	*Druk ukończono w lutym 1959 r.*
Cena zł 25.–	*Zam. nr 1084/58 – P-2*

WROCŁAWSKA DRUKARNIA NAUKOWA

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1958, 7, 181-193

J. Kwapiński

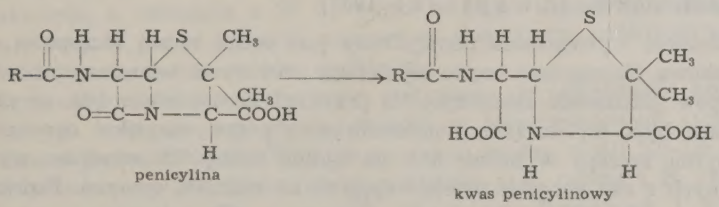
SWOISTE ENZYMY PRZECIWANTYBIOTYCZNE

Z Zakładu Mikrobiologii Akademii Medycznej w Warszawie

Wpłynęło dnia 19 maja 1958 r.

Penicylinaza jest aktywną substancją białkową, wytwarzaną przez pewne drobnoustroje. Ma ona charakter swoistego enzymu i antygenu. W odróżnieniu od licznych innych enzymów aktywność tego białka nie zależy od obecności wolnych grup aminowych lub sulfhydrylowych, ani od obecności żelaza lub miedzi w jego cząsteczce. Pospolite jony metali i utlenianie nie wpływają inaktywująco na penicylinazę, natomiast jest ona wrażliwa na czynniki redukujące (H e n r y i H o u s e w r i g h t 1947).

Mechaniczna aktywność penicylinazy polega na swoistym katalizowaniu reakcji hydrolizy cząsteczki penicyliny, która ulega przekształceniu w cząsteczkę kwasu penicylinowego, według następującego wzoru:



Enzym ten wykazuje wysoką swoistość dla konfiguracji cząsteczki penicyliny i nie działa na inne związki o podobnych ugrupowaniach chemicznych. Rodnik cząsteczki penicyliny ma ograniczone znaczenie w tym przypadku. Mianowicie penicyliny *G* i *X* są rozbijane szybciej niż penicyliny *F* i *K*.

Biologiczna aktywność penicylinazy polega też na pobudzaniu ustroju zwierzęcego do wytwarzania swoistego przeciwciała antyenzymatycznego.

Penicylinaza jest wytwarzana przez liczne bakterie, głównie przez gronkowce, pałeczki gramujemne nie zarodnikujące, a także przez gramdodatnie laseczki zarodnikujące. Niektóre szczepy bakterii wydzielają penicylinazę pozakomórkowo, np. szczepy pałeczki okrężnicy (Abraham i Chain 1940) oraz gronkowców (McKee i współpracownicy 1944, Körlof 1954). Często jednak enzym ten nie jest wydalany do otoczenia. Dotychczas wykazano wytwarzanie penicylinazy przez szczepy należące do następujących gatunków drobnoustrojów:

M. pyogenes (Kirby 1945, McKee i współpracownicy 1944, Housewright i Henry 1947, Chandler i Goltz 1952, Ortel 1955, Tacking 1953, Körlof 1954, Eriksen i Hansen 1954, Bondi, Saint Phalle, Kornblum i Most 1954a)

Mycob. tuberculosis (Woodruff i Foster 1945, Iland 1946, Kwapiński 1957)

List. monocytogenes (Ortel 1955)

Bac. anthracis (Barnes, Bondi i Dietz 1944, 1947)

B. subtilis (Royce i współpracownicy 1952, Eileen i współpracownicy 1954)

B. cereus (Housewright i Henry 1947, Sneath 1955)

Ps. aeruginosa (Tacking 1954a)

E. coli (Abraham i Chain 1940, Tacking 1954b)

Escherichia paracoli (Smith i Smith 1945, Harper 1943)

Sh. dysenteriae, Sh. paradysenteriae, Sh. sonnei (Barnes, Bondi, Dietz 1944, 1947)

S. typhi (Housewright i Henry 1947)

Cand. albicans (Kwapiński 1957)

Zdolność wytwarzania penicylinazy jest cechą raczej szczepową, niż gatunkową. Szczególnie często występują producenci tego enzymu wśród szczepów gronkowca złocistego. Na przykład Körlof stwierdził, że penicylinaza była wytwarzana pozakomórkowo przez wszystkie oporne na penicylinę szczepy w liczbie 613, na ogólną liczbę 720 szczepów wyhodowanych z ran chorych przebywających na oddziale oparzeń. Podobnie Wallmark (1954) wykazał, że wszystkie z 327 szczepów gronkowca złocistego oporne na 1 j. penicyliny na ml lub więcej wytwarzały penicylinazę.

Mechanizm wytwarzania penicylinazy nie został dokładnie wyjaśniony; jednak powstawanie tego enzymu zależy w dużym stopniu zarówno od pewnych konstytucjonalnych właściwości bakterii, jak też od warunków środowiska, np. od składu pożywki, a szczególnie od obecności penicyliny. Według doświadczeń Bondiego, Kornbluma i Saint Phalle (1954b) szczepy *M. pyogenes* wytwarzające penicylinazę mają konsty-

tucjonalnie mniejszą zdolność syntezy wszystkich aminokwasów, niezbędnych dla wzrostu szczepów wrażliwych na penicylinę.

Penicylina w pożywce (a zwłaszcza — dodawana stale do rozwijającej się hodowli bakterii) indukuje wytwarzanie penicylinazy o dużej mocy (Duthie 1944, Bellamy i Klimek 1948, Pollock 1950, Bondi i współpracownicy 1954b). Indukcyjne działanie wywiera penicylina również wówczas, gdy przepłukane i przewietrzone komórki bakterii (tzw. komórki spoczynkowe) lub komórki wysuszane eterem i acetonem wytrząsano w roztworze tego antybiotyku w ciągu kilku godzin (Sneath 1955, Geronimus i Cohen 1957). Gerónimus i Cohen w swych doświadczeniach wykazali 50-krotny wzrost aktywności penicylinazy 13 badanych szczepów gronkowców penicylino-opornych i koagulazo-dodatnich po wytrząśnięciu „spoczynkowych" komórek z penicyliną.

Preparaty penicylinazy, otrzymywane dotychczas, można podzielić na 3 grupy: 1) preparaty surowe, 2) preparaty (częściowo) oczyszczone, 3) penicylinaza krystaliczna. Do pierwszej grupy należą: „spoczynkowe" komórki drobnoustrojów, proszek acetonowo-eterowy przyrządzony z bakterii, materiał uwolniony z komórek rozbitych w dezintegratorze Mickle'a, lub przesącze hodowli otrzymane przy użyciu sączków bakteriologicznych.

Często używane preparaty acetonowo-eterowe przyrządzamy w następujący sposób (metoda Gibsona i Parkera 1948). Wyhodowane bakterie wytrząsamy z penicyliną, którą dodajemy do stężenia 25-100 j/ml, w temperaturze 37° w ciągu 60-75 minut. Następnie komórki odwirowujemy, zawieszamy w około 2 ml wody i wytrząsamy z 20 ml acetonu dwukrotnie, a następnie z 20 ml eteru w ciągu 1 godziny, odciągając płyn pipetą. W końcu komórki suszymy w eksykatorze próżniowym nad bezwodnym siarczanem miedzi w chłodni.

Preparaty częściowo oczyszczone otrzymano po precypitacji hodowli niektórych bakterii przy użyciu etanolu w 50-procentowym stężeniu, acetonu w koncentracji 50-70% lub siarczanu amonu w *pH* 5,0-7,5 i 8,8. Oczyszczone preparaty penicylinazy uzyskano z *B. cereus* i *B. subtilis* (Housewright i Henry 1947, Manson, Pollock i Fridgell 1954). Penicylinazę w postaci krystalicznej otrzymał Pollock (1956).

WYKRYWANIE PENICYLINAZY

Wytwarzanie penicylinazy przez drobnoustroje można wykazać przy użyciu prób jakościowych lub ilościowych. Dwie pierwsze z omówionych poniżej prób jakościowych można polecić do wstępnych badań nad produkcją penicylinazy przez drobnoustroje.

a) Metoda Sneatha (1955). Drobnoustroje hodujemy na płytce z agarem zawierającym 1% skrobi, po czym na powierzchnię kolonii wlewamy 1-procentowy roztwór jodu w jodku potasu oraz penicylinę w stężeniu 100 000 j/ml. Kolonie wytwarzające penicylinazę będą otoczone bladą obwódką na niebieskim tle podłoża. Przypuszczalnie substancją adsorbującą jod jest kwas penicylinowy. Podobną lecz mniej czułą próbę opisał poprzednio Perrot (1954).

b) Metoda cylinderkowa. Zawiesinę wzorcowego, wrażliwego na penicylinę szczepu gronkowca złocistego (np. nr *2091*) wlewamy na powierzchnię płytki agarowej i podsuszamy. Z kolei w kilku miejscach płytki umieszczamy wyjałowione cylinderki, które napełniamy roztworem penicyliny zmieszanym z zawiesiną badanego szczepu drobnoustrojów. Kontrolny cylinderek zawiera penicylinę bez bakterii. Po 18-godzinnej inkubacji w temperaturze 37° oglądamy płytkę ponownie. Brak strefy zahamowania wzrostu wzorcowego szczepu gronkowca wokół cylinderków napełnionych penicyliną i zawiesiną badanych drobnoustrojów świadczy o wytworzeniu penicylinazy. Wskazywać może na to również strefa niezupełnego zahamowania wzrostu gronkowca wyraźnie węższa niż wokół cylinderka kontrolnego.

c) Metoda „dwuotworkowa" Henneberga (1948) i Ortela (1955) opiera się na spostrzeżeniu, według którego strefa zahamowania wzrostu bakterii, wywołana przez dyfundującą do pożywki penicylinę, ulega zniekształceniu lub zniesieniu, jeśli w pewnej odległości od wgłębienia wypełnionego penicyliną znajduje się penicylinaza w drugim dołku. Próbę tę wykonuje się w następujący sposób: grubą płytkę agarową zasiewamy 18-godzinną hodowlą bulionową wrażliwego szczepu gronkowca złocistego i suszymy ją w temperaturze 37° w ciągu 30 minut. Z kolei wycinamy wyjałowionym korkoborem o średnicy 7 mm cztery równoległe wgłębienia, przy czym jedna para jest oddalona od drugiej o 2-3 mm. Do środkowych wgłębień wlewamy krople penicyliny w rozcieńczeniu 2 j/ml, a do zewnętrznych — zawiesinę badanych bakterii wysuszonych uprzednio acetonem i eterem, a następnie zawieszonych w płynie fizjologicznym w proporcji 1 eza na 1 ml. Po 18-godzinnej inkubacji w temperaturze 37° oglądamy płytkę, oceniając wynik badania na zasadzie wymienionej na początku opisu tej metody.

AKTYWNOŚĆ PENICYLINAZY

Aktywność penicylinazy można określać albo w stosunku do preparatu wzorcowego penicyliny (aktywność względna), albo w stosunku do mg oczyszczonego preparatu enzymu (aktywność swoista). Posługujemy się metodami fizyko-chemicznymi albo mikrobiologicznymi. Do pierwszej

grupy należą: metoda manometryczna Henry'ego i Housewrighta (1947), metoda jodometryczna opisana przez Perreta (1954) i Tuckera (1954) oraz metoda potencjometryczna Murtgaugha i Levy'ego (1945). Sposoby mikrobiologicznego badania aktywności penicylinazy opisali Liberman i Johnson (1956) oraz Ortel (1955). Metodę manometryczną można polecić jako najdokładniejszą. Omówimy z kolei poszczególne sposoby określania aktywności penicylinazy.

1. Metoda manometryczna. Badanie wykonujemy w aparacie Warburga w temperaturze 36°. Do naczynia głównego wlewamy: 1 ml roztworu badanego preparatu enzymatycznego i 3 ml roztworu dwuwęglanu sodowego. Stężenie roztworu dwuwęglanu zależy od *pH*, w którym zamierzamy przeprowadzić doświadczenie; zwykle przy *pH* 7,0. Boczne ramię zawiera 0,5 ml penicyliny (5000-10000 j.o.) w roztworze dwuwęglanu sodu. Próba kontrolna nie zawiera penicylinazy. Po uruchomieniu preparatu szybkość wytrząsania nastawiamy na 90-100 cykli/min. Gdy nastąpi zrównoważenie mieszaniny gazów, system zamykamy, a po ustaleniu się poziomów na manometrach przelewamy zawartość bocznego naczyńka do głównego. Wówczas rozpoczyna się działanie penicylinazy na penicylinę. Powstający kwas penicylinowy uwalnia z dwuwęglanu dwutlenek węgla. Ilość powstającego gazu odczytujemy na manometrach. Wyniki odkładamy na krzywej, wyrażając aktywność penicylinazy jako funkcję stężenia tego enzymu na podstawie reakcji rządu zerowego.

2. Metoda jodometryczna polega na badaniu stopnia adsorpcji jodu prawdopodobnie przez cząsteczki kwasu penicylinowego powstałego po przekształceniu penicyliny pod wpływem penicylinazy. Doświadczenie według Perreta wykonujemy w następujący sposób:

Do kolbki z doszlifowanym korkiem wlewamy 5 ml oziębionego w lodzie 0,007 N roztworu penicyliny w 0,2 M buforze fosforanowym o *pH* 6,5 i umieszczamy ją w łaźni o temperaturze 30°. Po 10 minutach dodajemy 2 ml preparatu enzymatycznego w 0,5-procentowej żelatynie. Płyn ten uprzednio ogrzewamy do 30°. Kolbkę wstrząsamy w ciągu 30 minut, z kolei wlewamy 10 ml odczynnika jodowego (ogrzanego do 30°) w celu przerwania reakcji enzymatycznej. Po 10 minutach kolbkę wyjmujemy z łaźni i płyn miareczkujemy 0,0166 N roztworem tiosiarczanu sodowego. W tych warunkach 1 ml jodku jest równoważny 2 μmolom rozbitej penicyliny. Dwie próby kontrolne wykonywane równolegle są bez penicylinazy oraz bez penicylinazy i penicyliny. Odczynnik jodowy zawiera: 0,0166 N jodu i 0,06 M jodku potasu w 1,75 M buforze octanowym o *pH* 4,0.

Czułość metody jest rzędu 0,04 j. enzymu. Jednostkę penicylinazy można wyrazić według stopnia rozbicia penicyliny, wynoszącego 1 μ mol/godzinę. Ilość penicylinazy powodująca ten stopień rozkładu peni-

cyliny przy zadziałaniu na 0,005 M benzylopenicyliną sodową w 0,2 M buforze fosforanowym o *pH* 6,5 w temperaturze 30° jest miarą jednostki tego enzynu. Zbliżoną metodę jodometryczną opisał Tucker (1954).

3. Metoda potencjometryczna opiera się na miareczkowaniu, przy użyciu potencjometru, kwasu penicylinowego powstałego po kolejnych okresach czasu działania penicylinazy na penicylinę. Mniej dokładnie można określić ilość kwasu penicylinowego miareczkowaniem przy użyciu 0,01 N ługu sodowego wobec czerwieni fenolowej jako wskaźnika.

Metodę mikrobiologiczną opisali Liberman i Johnson (1956) oraz Ortel (1955); pierwsza metoda jest dokładniejsza. Według techniki Libermana i Johnsona przygotowujemy zawiesinę spoczynkowych bakterii w buforze fosforanowym, o stężeniu równoważnym 1,5-9 mg suchej wagi komórek/ml. Koncentrację komórek bakterii w 1 ml buforu określamy, porównując z gęstością optyczną odpowiedniego standardu w fotokolorymetrze przy długości fali 660 mμ. Z kolei do 9 ml zawiesiny bakterii dodajemy 1 ml roztworu penicyliny o takim stężeniu, aby końcowa koncentracja wynosiła 100-3000 j/ml. Próbki 1 ml tej zawiesiny pobieramy bezpośrednio po dodaniu antybiotyku oraz kilkakrotnie w odstępach 20-minutowych. Następnie przerywamy działanie penicylinazy w pobranych próbkach, przelewając ich zawartość do 40 ml 1-procentowego buforu fosforanowego o *pH* 6,2, i gotowanie w ciągu 2 minut. W tych warunkach penicylinaza ulega całkowitemu unieczynnieniu, natomiast aktywność penicyliny pozostaje niezmieniona. Z kolei kolbkę z tą mieszaniną umieszczamy w łaźni lodowej i prędko ochładzamy. Próbki ochłodzonego płynu rozcieńczamy buforem w postępie geometrycznym i stężenie resztkowej penicyliny oznaczamy biometrycznie w stosunku do hodowli wzorcowego wrażliwego szczepu gronkowca złocistego.

Szybkość rozkładu (V) penicyliny spowodowanego przez penicylinazę określamy według stopnia rozbicia penicyliny podczas początkowych 20 minut, według wzoru (który podaję w ogólniejszej formie):

$$V = \frac{S}{n \cdot D \cdot i}$$

gdzie V = szybkość unieczynnienia penicyliny, S = ilość jednostek penicyliny rozłożonej, n = czas w godzinach, D = gęstość optyczna zawiesiny bakterii wyrażona w mg suchej wagi komórek bakterii, i = ilość ml zawiesiny bakterii użytej w doświadczeniu.

Metoda Ortela. W trzech probówkach przygotowujemy następującą mieszaninę: 0,1 ml zawiesiny proszku z bakterii wysuszonych acetonem, przyrządzonej w 0,85% NaCl, przenosimy do roztworu penicyliny o mocy 10 j/ml i dopełniamy płynem fizjologicznym do 2 ml. Pierwszą próbkę inkubujemy w temperaturze 4°, drugą w 18° i trzecią w 37° w ciągu

30 minut. Czwartą, kontrolną probówkę, zawierającą 2 ml roztworu penicyliny o mocy 5 j/ml przechowujemy w temperaturze 37° przez 30 minut. Po tym okresie czasu pobieramy z każdej probówki 0,05 ml zawiesiny i wykonujemy badanie aktywności penicylinazy metodą „dwuotworkową" opisaną na str. 184. Zwężenie strefy zahamowania pozwala obliczyć zarówno stopień inaktywacji penicyliny, jak też stopień aktywności penicylinazy.

WŁAŚCIWOŚCI FIZYKO-CHEMICZNE PENICYLINAZY

Aktywność penicylinazy zależy od następujących czynników: indywidualne, bliżej nie określone właściwości biologiczne drobnoustrojów, wiek hodowli, skład pożywki, stężenie penicyliny w środowisku, temperatura i *pH* użyte do inkubacji bakterii, jak również warunki, w których wykonano badanie czynności penicylinazy.

Jak już wspomniano w poprzednich rozdziałach, zdolność wytwarzania penicylinazy jest cechą raczej szczepową, choć stosunkowo częściej tę właściwość spotyka się wśród drobnoustrojów należących do rodzaju *Bacillus* i gatunku *M. pyogenes*. W większości przypadków istnieje ścisła zależność między opornością na penicylinę a aktywnością penicylinazy wytwarzanej przez szczep bakterii (S p i n k i F e r r i s 1947).

Szczepy z gatunków *B. cereus* i *B. subtilis* wytwarzają stosunkowo najaktywniejszą penicylinazę; trochę mniej aktywny jest enzym produkowany przez *M. pyogenes var. aureus* i *E. coli*, natomiast słabymi producentami penicylinazy są szczepy *Ps. aeruginosa*. Powyższy wniosek

Gatunek bakterii	Aktywność penicylinazy wyrażona w:		Autorzy
	µl CO_2/h/mg	j. penicyliny zinaktywowanej w 1h	
B. cereus	3 940	—	Bondi i współpracownicy—1954a
M. pyogenes	118	—	
B. subtilis	—	400 000	Royce i współpracownicy—1952
M. pyogenes	—	10 000	Tacking — 1953, 1954a, b
E. coli	—	5 000	
Ps. aeruginosa	—	500	

trzeba jednak oceniać z pewną rezerwą, gdyż wyniki uzyskane przez różnych autorów różnymi metodami są mało porównywalne. W tym świetle należy przyjmować powyższe zestawienie obrazujące maksymalną aktywność penicylinazy różnych gatunków bakterii.

Stosunkowo największe stężenie penicylinazy znajduje się w młodych 20-godzinnych hodowlach bakteryjnych, natomiast w starszych jest ona znacznie niższa. Obrazuje to tabelka zaczerpnięta z pracy Bondiego i współpracowników (1954), wyobrażająca aktywność pinicylinazy w 1 µl CO_2/h/mg:

Wiek hodowli h	µl CO_2 /h/ mg
20	54,3
44	20,8
68	5,5

Skład pożywki użytej do hodowli bakterii ma pewien, dotychczas bliżej nie zbadany, wpływ na wydajność penicylinazy. Na przykład aktywność tego enzymu w gronkowcach hodowanych w bulionie wynosiła 53 µl CO_2/h/mg, natomiast była prawie trzykrotnie wyższa (140 µl) w gronkowcach wyhodowanych w pożywce syntetycznej, zawierającej następujące aminokwasy i substancje wzrostowe: glicynę, cystynę, leucynę, argininę, prolinę, tryptofan, walinę, kwas glutaminowy, fenyloalaninę, kwas asparaginowy, tioninę, biotynę i amid kwasu nikotynowego (Bondi i współpracownicy). Nie rozwiązane jest jednak zagadnienie wpływu tych składników chemicznych na syntezę cząsteczki penicylinazy.

Optymalna temperatura dla produkcji i aktywności penicylinazy bakterii wynosi, zależnie od gatunku, 22-25° lub 36°, a optymalne *pH* 7,2-7,8 (Henry i Housewright 1947, Royce i współpracownicy 1952). Przy nadmiarze penicyliny szybkość reakcji penicylinazy z substratem jest stała w każdym stężeniu jonów wodorowych i w każdej temperaturze, a zależy wyłącznie od stężenia penicylinazy (Royce i współpracownicy 1952).

Penicylina dodana do pożywki podczas hodowli bakterii lub działająca na spoczynkowe komórki wywiera silny wpływ indukcyjny. Spośród 57 szczepów *B. cereus* zbadanych przez Sneatha (1955) 56 szczepów wytwarzało penicylinazę dopiero po kilkugodzinnym wytrząsaniu ich w roztworze penicyliny. Według dokładniejszych badań Eriksena i Hansena (1954) aktywność penicylinazy proszków acetonowo-eterowych przygotowanych z gronkowców indukowanych penicyliną była około 16-18-krotnie wyższa niż penicylinazy gronkowców nie indukowanych. Mianowicie aktywność penicylinazy wyrażana w mikromolach rozbitej penicyliny /mg N/ 30 minut, wynosiła 189-209 w komórkach indukowanych, a 11,4-11,9 w nieindukowanych. W badaniach Mansona i współpracowników (1954) stała Michaelisa dla aktywności indukowanej penicylinazy *B. subtilis* wynosiła 116 j/ml ($1{,}98 \times 10^{-4}$ M) a nieindukowanej

103 j/ml ($1{,}76 \times 10^{-4}$ M). Podobne wnioski wynikają z doświadczeń Bondiego i współpracowników (1954). Wykazali oni, że aktywność penicylinazy spoczynkowych komórek *B. cereus* i *M. pyogenes* była stosunkowo wyższa w bakteriach wyhodowanych na pożywce zawierającej penicylinę w wyższym stężeniu niż w pożywce z niską zawartością lub bez tego antybiotyku. Różnice te obrazuje tabelka, przedstawiająca aktywność penicylinazy *B. cereus*, wyrażoną w µl CO_2/h/mg.

Stężenie penicyliny j/ml	µl CO_2 /h/mg
0	540
1	2620
100	3940
1000	3000

Preparaty oczyszczonej penicylinazy są na ogół dość trwałe i w ciągu $^1/_2$ roku nie tracą więcej niż kilka procent swej mocy.

Po dializie względem wody w temperaturze pokojowej następuje ponad 50-procentowe obniżenie aktywności preparatów penicylinazy. Preparaty enzymu wykazują różny stopień wrażliwości na podwyższoną temperaturę, zależnie od gatunku bakterii. Na przykład aktywność penicylinazy *B. cereus* ulega obniżeniu o około 55% po 5 minutach w temperaturze 100°, natomiast penicylinaza *B. subtilis* ulega osłabieniu w tych warunkach tylko o 20% (Manson i Pollock 1953). Żelatyna w 1-procentowym roztworze ma działanie ochronne w stosunku do wpływu temperatury. Dla badania aktywności penicylinazy optymalne stężenie substratu, zwłaszcza w *pH* 7,2 wynosi od 100-1000 j. penicyliny ml. Optymalna temperatura waha się, zależnie od gatunku bakterii, w granicach 22-25° lub 36°, a optymalne *pH* w granicach 6-7,8 (Henry i Housewright 1947, Royce i współpracownicy 1952, Manson, Pollock i Trigell 1954). Zależność między stężeniem preparatu enzymu i jego działaniem (ilością mg suchej masy komórek bakteryjnych, zawierających penicylinazę) jest linijna, jak wykazali Eriksen i Hansen (1954) w swych badaniach.

Inhibitorami penicylinazy *in vitro* (w pewnych doświadczeniach także *in vivo*) są niektóre antybiotyki: aureomycyna (Chandler i Goltz 1952) oraz swoista substancja serologiczna, antypenicylinaza. Mechanizm działania inhibitorów penicylinazy nie został bliżej poznany. W odniesieniu do antybiotyków można wnioskować, że ich działanie polega na wiązaniu się z cząsteczką penicylinazy, a nie na uszkodzeniu komórkowego aparatu syntezy tego enzymu. Wskazują na to doświadczenia Chandlera i Goltza (1952). Wykazali oni, że wprawdzie po 10

pasażach w pożywce z aureomycyną 22% szczepów *M. pyogenes* penicylino-opornych i wytwarzających penicylinazę przestało syntetyzować ten enzym w środowisku zawierającym eureomycynę: jednak po przesianiu do podłoża bez aureomycyny bakterie produkowały penicylinazę.

Penicylinaza ulega także unieczynnieniu wskutek adsorpcji na cząsteczkach azbestu, proszku porcelanowego, szklanego, i wodorotlenku glinu, a także na preparacie Norit A i perełkach szklanych, a więc adsorbuje się na filtrach Seitza, Berkefelda i Schotta, natomiast nie ulega adsorpcji na filtrach gradokolowych (Czekałowski 1950, Housewright i Henry 1947, Eriksen i Hansen 1957, Kwapiński 1957).

ZNACZENIE PENICYLINAZY DLA MAKROORGANIZMU

Omówimy dwa aspekty znaczenia penicylinazy dla makroorganizmów: 1) Szkodliwe działanie tego enzymu dla makroorganizmu, wskutek znoszenia działania penicyliny stosowanej w celach leczniczych, 2) antygenowe właściwości penicylinazy oraz wpływ jej na wytwarzanie antypenicylinazy w ustroju.

Penicylinaza wydzielona *in vivo* pozakomórkowo przez niektóre szczepy bakterii, np. *M. pyogenes v. aureus, Ps. aeruginosa, E. coli,* wstrzymuje leczniczy wpływ penicyliny podawanej nawet w wysokich dawkach, jeśli bakterie wrażliwe na ten antybiotyk znajdują się w miejscu zakażenia obok bakterii wytwarzających penicylinazę. Zjawisko to, mające charakter tylko lokalny, zostało wykazane doświadczalnie przez Tackinga (1954, 1955). Tuneval (1955) na podstawie swych obserwacji wnioskuje, że penicylinaza wydzielona przez penicylino-oporne gronkowce może znosić wpływ penicyliny na paciorkowce znajdujące się wraz z nimi w migdałkach, przyczyniając się do długotrwałego nosicielstwa paciorkowców, pomimo leczenia penicyliną.

Penicylinaza oczyszczona posiada właściwości pełnowartościowego, choć słabego antygenu. Doświadczalnie wykazano, że po dożylnym wstrzyknięciu preparatu penicylinazy królikom, powstawało przeciwciało antyenzymatyczne, antypenicylinaza o niskim mianie 1:64 do 1:256. Przeciwciało to, łącząc się *in vitro* z penicylinazą, wytrącało się w obecności elektrolitów w postaci strątu (Perlstein i Liebmann 1945). Antypenicylinaza znajdująca się w surowicy uodpornionych królików przyczyniała się do zwiększonej wrażliwości na penicylinę bakterii wytwarzających penicylinazę pozakomórkowo (Housewright i Henry 1947, Tacking 1955).

Preparaty penicylinazy otrzymane z różnych gatunków bakterii są immunologicznie odrębne. Wskazują na to badania Mansona, Pol-

locka i Tridgella (1954). Autorzy ci stwierdzili, że antypenicylinaza wytworzona po uodpornieniu królików penicylinazą *B. cereus* nie powodowała inaktywacji indukowanego preparatu penicylinazy *B. subtilis*.

W badaniach nad budową antygenową penicylinazy stosuje się odczyn precypitacji według Culbertsona, polegający na nawarstwianiu surowicy odpornościowej na roztwór penicylinazy, po czym próbki inkubuje się w temperaturze 37° w ciągu 2 godzin i w temperaturze 5° przez noc.

Preparaty penicylinazy znalazły także praktyczne zastosowanie do badania jałowości preparatów penicyliny (Harper 1943, Lawrence 1943, Proom 1945, Pile i współpracownicy 1947) oraz w diagnostyce bakteriologicznej (Housewright i Henry 1947).

Badanie jałowości penicyliny polega na następującej zasadzie. Preparaty penicylinazy rozbijają penicylinę w ciągu 30-60 minut w temperaturze pokojowej i produkty rozbitej penicyliny nie powodują zahamowania wzrostu gronkowca złocistego wrażliwego na penicylinę.

W diagnostyce bakteriologicznej można używać penicylinazy do uzyskiwania hodowli bakterii z płynów ustrojowych, do których dyfundowała penicylina stosowana w celach leczniczych. Wykonując to badanie mieszamy 1 ml próbki materiału z 0,1 ml roztworu preparatu penicylinazy i wylewamy na podłoża. Badanie takie może zapobiec tzw. „fałszywie ujemnym" wynikom badania bakteriologicznego w przypadkach leczonych penicyliną.

STREPTOMYCYNAZA

Sureau, Arquie, Boyer i Saviard (1948) w swych doświadczeniach wykazali, że filtraty hodowli szczepu *Pseudomonas aeruginosa* (wyizolowanego z ustroju chorego na zapalenie opon mózgowych, leczonego streptomycyną) oraz szczepu *Streptococcus faecalis* znosiły antybiotyczne działanie streptomycyny. 0,05 ml przesączu wstrzymywało całkowicie hamujący wpływ 50-100 µg streptomycyny na wzrost gronkowca złocistego.

Swoisty czynnik, nazwany streptomycynazą, który według wniosków autorów miał charakter enzymatyczny, nie wpływał na penicylinę i nie posiadał aktywności antybiotycznej. Potrzebne są jednak dokładne badania nad właściwościami tej substancji, poprzedzone jej oczyszczeniem.

Prawdopodobnie oporność drobnoustrojów względem innych antybiotyków może zależeć niekiedy od swoistych adaptywnych enzymów przeciwantybiotykowych wytwarzanych i wydzielanych przez mikroorganizmy.

LITERATURA

Abraham E., Chain E., 1940: *Nature*, **146**: 937.
Barnes J., Bondi A., Dietz S., 1944: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **56**: 132.
Barnes J., Bondi A., Dietz S., 1947: *J. Path. Bact.* **59**: 113.
Bellamy W., Klimek J., 1948: *J. Bact.* **55**: 153.
Bondi A., Saint Phalle M., Kornblum J., Moat A., 1954a: *Arch. Biochem. Biophys.* **53**: 348.
Bondi A., Saint Phalle M., Kornblum J., Moat A., 1954b: *J. Bact.* **68**: 617.
Chandler C., Goltz E., 1952: *Bull. J. Hopk. Hosp.* **91**: 475.
Czekalowski J., 1950: *J. Path. Bact.* **62**: 85.
Duthie E., 1944: *Brit. J. exp. Path.* **25**: 96.
Eileen E., Manson D., Pollock M., Tridgell E., 1954: *J. gen. Microbiol.* **11**: 493.
Eriksen K., Hansen D., 1954: *Acta Path. Microbiol. Scand.* **35**: 168.
Geronimus L., Cohen S., 1957; *J. Bact.* **73**: 28.
Gibson B., Parker R., 1948: *J. Bact.* **55**: 801.
Gots J., 1945: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **6**: 165.
Harper G., 1943: *Lancet.* 2:509.
Hennenberg G., 1948: Einführung in bakteriol. Untersuchungstechnik.
Henry R., Housewright R., 1947: *J. Biol. Chem.* **167**: 553.
Housewright D., Henry R., 1947: *J. Bacteriol.* **53**: 241.
Iland C., 1946: *J. Path. Bact.* **58**: 495.
Kirby W., 1945: *J. Clin. Invest.* **24**: 170.
Körlof B., 1954: *Acta Path. Microbiol. Scand.* **35**: 402.
Kwapiński J., 1954: *Polski Tygodnik Lekarski*, **9**: 1.
Kwapiński J., (1957 — nie opublikowane).
Lawrence C., 1943: *Science.* **98**: 413.
Liberman S., Johnson M., 1956: *J. Bact.* **72**: 831.
McKee, Rake G., Houck C., 1944: *J. Bact.* **47**:187.
Manson E., Pollock M., Fridgell E., 1954: *J. gen. Microbiol.* **11**:493.
Murtangh, Levy, 1945: *J. Amer. Chem. Soc.* **67**: 1042.
Ortel S., 1955: *Zentr. Bakter.* **162**: 201.
Perlstein D., Liebman A., 1945: *Science.* **102**: 174, 197.
Perret C., 1954: *Nature.* **174**: 1012.
Pile M., Stewart D., Standfast A., 1947: *J. gen. Microbiol.* **1**: 244.
Pollock M., 1950: *Brit. J. exp. Path.* **31**: 379.
Pollock M., 1951, *J. gen. Microbiol.* **5**: 11.
Proom H., 1945: *Brit. J. exp. Path.* **26**: 98.
Royce A., Bowler C., Sykes G., 1952: *J. Pharm. Pharmacol.* **4**: 904.
Smith W., Smith Ch., 1945: *Lancet.* **1**: 809.
Sneath P., 1955: *J. gen. Microbiol.* **13**: 561.
Spink W., Ferris V., 1947: *J. Clinic. Invest.* **26**: 379.
Sureau B., Arguie E., Boyer F., Saviard M., 1948: *Ann. Inst. Pasteur.* 75:169.

Tacking R., 1953: *Acta Path. Microbiol. Scand.* **32**:375.
Tacking R., 1953: *Acta Path. Microbiol. Scand.* **35**:445.
Tacking R., 1954: *Nature.* **173**: 726.
Tunnevall G., 1955: *Acta Path. Microbiol. Scand.* **36**: 61, 471.
Tucker R., 1954: *Nature.* **173**: 85.
Wallmark G., 1954: *Acta Path. Microbiol. Scand.* **34**: 182.
Woodruff H., Foster J., 1945: *J. Bact.* **49**: 7.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1958, 7, 195-200

L. Lepszowa i *Z. Lepszy*

ZASTOSOWANIE TEORII ELEKTROFOREZY MIKROSKOPOWEJ SMOLUCHOWSKIEGO W MIKROBIOLOGII

CZĘŚĆ I. WSTĘP TEORETYCZNY I RYS HISTORYCZNY

Z Katedry Fizyki Politechniki w Krakowie

Wpłynęło dnia 15 maja 1958 r.

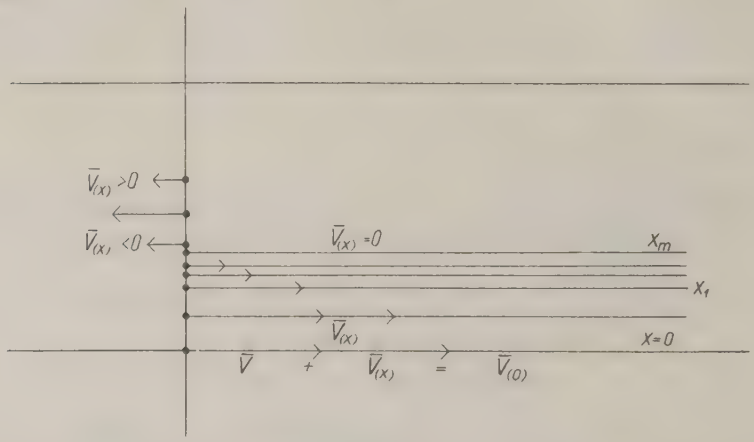
Prace nad zastosowaniem teorii elektroforezy mikroskopowej Smoluchowskiego w mikrobiologii, datujące się od r. 1921, miały na celu wykorzystanie mikroskopowych, szybkich pomiarów prędkości migracji drobnoustrojów w polu elektrycznym do badań zmian ich stanu fizjologicznego zachodzących pod wpływem: środków dezynfekcyjnych, podwyższonej temperatury (Buggs i Green 1935) i promieni γ (Smith 1936). Starano się też znaleźć przy pomocy elektroforezy różnice między bakteriami zjadliwymi a niezjadliwymi (Falk 1926, 1928, Broom i Brown 1932, Mudd i Lucke 1928) oraz wyzyskać tę metodę dla kontroli wzrostu hodowli bakteryjnych (Abramson 1939, Ralston 1922, Mattson 1922, Moyer 1936, 1938).

Prace te rozpoczęto dopiero po stwierdzeniu, że teoretyczne badania Smoluchowskiego nad teorią koagulacji, dyfuzji i statystyką koloidów, mogą stanowić podstawy nowoczesnej technologii kauczuku i celulozy.

Przed omówieniem wyników tych prac podajemy opis zjawiska elektroforezy mikroskopowej, z uwzględnieniem podstawowych faktów, na których teoria się opiera (Smoluchowski 1914).

Teoria odnosi się tylko do płaskiej równoległej warstwy zawiesiny, której grubość d jest bardzo mała w stosunku do długości i szerokości. Jeżeli warstwę taką włączymy w obwód elektryczny prądu stałego, to stwierdzamy pomiarami mikroskopowymi, że cząstki znajdujące się na dnie warstwy, czyli w głębokości $x=0$, poruszają się do katody z prędkością $\overline{V}(o)$. W warstwach wyżej położonych prędkość $\overline{V}(o)$ maleje: w końcu w pewnej głębokości $x=X_n$ cząstki już nie poruszają się, mimo

że pozostają w polu elektrycznym. W głębokościach $x > X_n$ prędkość cząstek $\overline{V}(x)$ jest > 0, lecz cząstki poruszają się tu ku anodzie. W środku warstwy cząstki poruszają się do anody z maksimum prędkości.



Rys. 1.

Taki rozkład prędkości cząstek w zależności od głębokości warstwy x, który powstaje w płaskiej i równoległej warstwie zawiesiny umieszczonej w polu elektrycznym prądu stałego, stwierdził po raz pierwszy fizyk angielski Ellis (1911). Ze swoich pomiarów wywnioskował, że prędkość „mierzona" cząstek, $\overline{V}(x)$, nie jest rzeczywistą prędkością cząstek zawieszonych w cieczy. Rys. 1 przedstawia rozkład prędkości cząstek według Ellisa.

PODSTAWOWE POJĘCIA TEORII ELETROFOREZY MIKROSKOPOWEJ SMOLUCHOWSKIEGO

Oprócz pojęcia prędkości „mierzonej" cząstek, wprowadza Smoluchowski do teorii pojęcie rzeczywistej prędkości cząstek $\overline{V}$. Jest ona zależna od ładunku elektrycznego cząstek, znajdującego się na ich powierzchni. $\overline{V}$ jest wektorem stałym w całej warstwie zawiesiny, który nie zmienia ani kierunku, ani wartości liczbowej w danej próbce zawiesiny.

$$\overline{V} = \text{constans}, \tag{1}$$

$$\overline{V} \neq \overline{V}(x) \tag{2}$$

Zmiany stanu fizjologicznego drobnoustrojów, zarówno jak i zmiany fizyczno-chemicznych właściwości cząstek nieożywionych w zawiesinach

i roztworach koloidowych, związane są ze zmianami ich ładunku elektrycznego. Zmiany te mierzymy zmianami prędkości rzeczywistej cząstek $\bar{V}(x)$.

Trzecim podstawowym pojęciem teorii jest pojęcie prędkości „rzeczywistej" drobin cieczy $\bar{v}(x)$, w której drobnoustroje czy cząstki są zawieszone. Na podstawie pomiarów Ellisa i innych badaczy Smoluchowski wyprowadza dedukcyjnie wzór na rozkład prędkości drobin cieczy w równoległej warstwie zawiesiny pod wpływem sił pola elektrycznego prądu stałego. Według praw hydrodynamiki rozkład ten ujmuje w następującą funkcję hydrodynamiczną:

$$f(\bar{x})=\bar{v}(x)=\bar{v}(0)\left\{1-6\left[\frac{x}{d}-\left(\frac{x}{d}\right)^2\right]\right\}, \tag{3}$$

z którego wynika, że $\bar{v}(x)$ zależy w następujący sposób od głębokości warstwy x:

x musi leżeć w przedziale liczb ... 0 ... d, drobiny cieczy poruszają się do katody z maksymalną prędkością na dnie warstwy czyli przy $x=0$, Jak wynika ze wzoru, wtedy:

$$\bar{v}(x)=\bar{v}(0)=\text{maksimum}.$$

Przy $x > 0$ drobiny cieczy poruszają się do katody aż do głębokości x_1, w której to głębokości nie poruszają się. Przy $x > x_1$ drobiny cieczy poruszają się do anody, aż do głębokości x_2, w której znowu ich prędkość $\bar{v}(x_2) = 0$. Przy $x > x_2$ drobiny cieczy poruszają się znowu do katody.

Zatem: drobiny cieczy poruszają się do katody przy

$$x < x_1,$$
$$x > x_2,$$

przy $x = x_1$,
$x = x_2$,

drobiny cieczy nie poruszają się wcale, przy

$$x > x_1,$$
$$x < x_2 \text{ poruszają się do anody.}$$

Głębokości x_1 i x_2 możemy wyliczyć ze wzoru (3) zakładając, że $\bar{v}(x) = 0$ i otrzymujemy na nie wyrażenia:

$$x_1=d\left(\frac{1}{2}-\frac{1}{\sqrt{12}}\right),$$

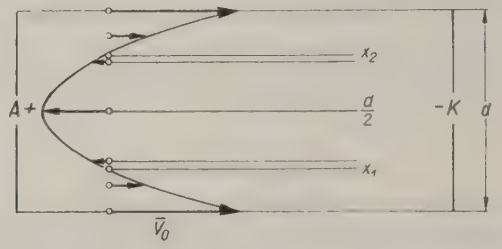
$$x_2=d\left(\frac{1}{2}+\frac{1}{\sqrt{12}}\right). \tag{4}$$

Rozkład prędkości drobin cieczy Smoluchowskiego dany wzorem (3) nie może być sprawdzony bezpośrednimi pomiarami, ponieważ drobin nie

widzimy pod mikroskopem. Zawieszone w cieczy drobnoustroje czy cząstki informują nas tylko w przybliżeniu o ruchu drobin cieczy, dzięki zależności prędkości „mierzonej" cząstek od głębokości warstwy. Teoria wyjaśnia, że dostępna naszym pomiarom prędkość cząstek „mierzona" $\overline{V}(x)$ jest sumą geometryczną rzeczywistej prędkości $\overline{V}$ i prędkości cieczy $\overline{v}(x)$.

$$\overline{V}(x) = \overline{V} + \overline{v}(x). \tag{5}$$

Dane otrzymane na podstawie częściowej analizy wzorów (3) oraz (5) pozwalają wyznaczyć rozkład prędkości drobin cieczy w równoległej i płaskiej warstwie zawiesiny, pozostającej pod wpływem potencjalnych sił pola elektrycznego, w zależności od głębokości warstwy x.



Rys. 2.

Rys. 2 podaje graficznie wzór na rozkład prędkości drobin cieczy.

Według zależności (4) w głębokościach x_1 i x_2 prędkość drobin cieczy $v(\bar{x}) = 0$. W tych głębokościach zostaje wyeliminowana z pomiarów $v(x)$. Istnieje tam „stan stacjonarny cieczy", drobiny jej nie poruszają się.

Zatem w głębokościach warstwy x_1 i x_2 prędkość mierzona $\overline{V}(x)$ jest równa rzeczywistej prędkości cząstek $\overline{V}$.

$$\overline{V}(x) = \overline{V}. \tag{6}$$

Teoretyczne podstawy metody pomiaru prędkości migracji cząstek w polu elektrycznym, a więc rozkład prędkości drobin cieczy i wynikający z niego wzór (4), były podstawą pomiarów prędkości migracji drobnoustrojów w polu elektrycznym. Pomiary te nie dały jednak wyników, gdyż nie udało się zmierzyć głębokości warstwy x_1 i x_2. Wzory te są teoretycznie uzasadnione, głębokości x_1 i x_2 istnieją realnie, drobiny cieczy nie poruszają się zatem w tej głębokości warstwy, x_1 i x_2 musielibyśmy dokładnie zmierzyć przy pomocy podziałki śruby mikrometrycznej mikroskopu. Niestety nastawienie objektywu o dużej ogniskowej dokładnie na

określoną głębokość warstwy jest trudne, jak stwierdzili to liczni badacze.

Drugi sposób wykorzystania teorii elektroforezy mikroskopowej do pomiaru prędkości migracji cząstek polegał na pomiarze czasu potrzebnego im do przebycia drogi s w jednostkowym polu elektrycznym i wyliczenia z tych pomiarów ich prędkości. Prędkość cząstek $\overline{V}(x)$ mierzono w głębokości $x=d/2$, czyli w środku warstwy, mierząc jednocześnie $V(0)$, czyli prędkość cząstek na dnie warstwy.

Obliczając ze wzoru (3) $\overline{v}(x)$ czyli prędkość drobin cieczy w danej głębokości warstwy, otrzymuje się dwa równania pierwszego stopnia o dwóch niewiadomych, z których po wyrugowaniu $\overline{v}(x)$ wyliczyć można rzeczywistą prędkość cząstek $\overline{V}$.

Liczne tego rodzaju pomiary nie wykazały praktycznej przydatności teorii Smoluchowskiego. Rozważania teoretyczne dotyczące tego zagadnienia oraz liczne już pomiary i doświadczenia należy zatem uważać dopiero za wstępne prace przy opracowaniu ilościowej, mikroskopowej metody pomiaru stanu fizjologicznego drobnoustrojów, opartej o zjawiska fizyczne.

Thompson (1942), omawiając wyniki prac wielu bakteriologów i biologów zagranicznych (Pedlow i Lisse 1926, Tourilla 1928, Bull 1930, Horwitz 1939, Gils 1932), stwierdza, że badania nad stanem fizjologicznym drobnoustrojów w oparciu o teorię elektroforezy Smoluchowskiego mogą być rozwiązane dopiero po opracowaniu przez fizyków specjalistów mikroskopowej, ilościowej metody pomiaru prędkości migracji cząstek w zawiesinie.

W następnych artykułach przedstawimy nasze usiłowania w tym kierunku oraz wstępne wyniki.

LITERATURA

H. A. Abramson, 1939: The determination of the electric charge of surfaces by the microscopic method of electrophoresis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **39**: 121.

J. C. Broom and H. C. Brown, 1932: Migration rate and virulence of C. *diphteriae*. *J. Brit. Exp. Pathol.* **13**: 337.

C. W. Buggs and R. C. Green, 1935: Electrophoretic velocities of virulent and non-virulent C. *diphteriae*. *J. Bact.* **30**: 447.

H. B. Bull, 1935: Electrokinetics XIV. A. Critical comparison of electrophoresis streaming potential and electroosmosis. *J. Phys. Chem.* **39**: 577.

R. Ellis, 1911: The properties of oil emulsions 1. The electrical charge. *Z. Phys. Chemie.* **78**: 321.

I. S. Falk, 1926: Electrophoretic potential and the virulence of bacteria. *J. Publ. Health.* **16**: 1102.

S. Mattson, 1928. Cataphoresis and the electrical neutralization of colloidal material. *J. Phys. Chem.* **32**: 1532.

L. S. Moyer, 1936: A suggested standart method for investigation of electrophoresis. *J. Bact.* **31** : 531.

L. S. Moyer, 1938: Comparisons of electro-osmosis, electrophoresis and streaming potential and their theoretical significance. *Trans. Electrochem. Soc.* **73** : 481.

S. Mudd, B. Lucké, 1928: Methods of studying the surfaces of living cells, with especial reference to the relation between the surface properties and phagocytosis of bacteria. *Colloid Symposium Monographs,* **6**: 131.

O. C. Ralston, 1922: Electrosmosis and electrophoresis, two definitions. *Trans. Electrochem. Soc.* **42** : 269.

W. S. Smith, 1936: The effect of certain X rays on the electrophoretic mobility of *E. coli. J. Bact.* **31** : 275.

M. Smoluchowski, 1914: Elektrische Endosmose und Strömungs-ströme. L. Graetz. Handbuch der Elektrizität und Magnetismus.

M. Thompson, 1942: Principles of microelectrophoresis cells. *Faraday Soc.* **81**.

P. Tuorilla, 1928: An ultramicroscopic method for determining the magnitude of charge of colloidal particles. *Kolloid. Z.* **44** : 11.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1958, 7, 201-207

M. Decowski i *T. Sozański*

WYTWARZANIE HIALURONIDAZY PRZEZ WŁOSKOWIEC RÓŻYCY

I. WYSTĘPOWANIE

Z Zakładu Mikrobiologii Instytutu Weterynaryjnego w Puławach

Wpłynęło dnia 27 czerwca 1958 r.

O stopniu zainteresowania się świata naukowego układem kwas hialuronowy-hialuronidaza świadczy bardzo bogate piśmiennictwo fachowe obejmujące przeszło 1500 prac. Całokształt współcześnie przeprowadzonych badań nad oczyszczaniem oraz właściwościami fizyko-chemicznymi składowych układu, nad ich występowaniem w drobnoustrojach i wyższych organizmach, ich znaczeniem dla przebiegu procesów fizjologicznych i patologicznych oraz nad wykorzystaniem hialuronidazy w celach leczniczych ujęli w sposób syntetyczny Duran-Reynals (1950), Kulonen (1951), Zabłocki (1948, 1955), Gibian (1954), Meyer (1947) oraz Meyer i Rapport (1952). W odrębnej publikacji Tolksdorf (1954) zebrała wszystkie współczesne metody wykrywania i oznaczania hialuronidazy.

Pierwotnie hialuronidaza znana była pod nazwą czynnika dyfuzyjnego lub czynnika przenikania ze względu na jej właściwości ułatwiania rozprzestrzeniania się drobnoustrojów lub innych ciał w okoliczne tkanki miejsca zastrzyku lub infekcji.

Działanie jej polega na enzymatycznej hydrolizie śluzowielocukrowca o wysokiej lepkości, zwanego kwasem hialuronowym, którego zadaniem m. in. jest cementowanie komórek podstawowej substancji tkanki łącznej, stanowiącej zaporę przeciwko inwazji drobnoustrojów. Powstałe przez jego rozkład rozluźnienie wiązań pomiędzy poszczególnymi komórkami stwarza dogodne warunki do przenikania zarazków w głąb tkanek i rozszerzenia się infekcji.

Hialuronidazy pochodzenia bakteryjnego posiadają prawdopodobnie

strukturę składającą się nie z jednego lecz z kompleksu enzymów. Są one niestałe, w hodowlach występują częstokroć w bardzo małej ilości, co w niektórych przypadkach nastręcza duże trudności w ich wykrywaniu. Mogą mieć charakter wewnątrz- lub zewnątrzkomórkowy. Czasami występowanie ich *in vitro* stanowi cechę tylko poszczególnych szczepów w obrębie danego gatunku drobnoustroju. Dodatek kwasu hialuronowego do podłoża w wydatnym stopniu wzmaga ilość wytwarzanej hialuronidazy i to w stosunku proporcjonalnym do ilości kwasu. Hialuronidazy posiadają też właściwości antygenowe, pobudzając ustrój do wytwarzania ściśle specyficznych przeciwciał (antyhialuronidazy) związanych z frakcją globulinową białka surowic. Przeciwciała te należy odróżnić od nieswoistych inhibitorów hialuronidazy (antyinwazyny) związanych z frakcją albuminową białka występujących w normalnych surowicach i działających hamująco na czynności hialuronidaz, niezależnie od źródła ich pochodzenia.

Dotychczas za hialuronidazo-dodatnie zostały uznane: paciorkowce grup *A, B, C, G* oraz *Str. mitis*, gronkowiec złocisty, dwoinka zapalenia płuc, pałeczka zakaźnego ronienia, pałeczka ropy błękitnej, pałeczka odmieńca, maczugowiec błonicy, przecinkowiec cholery, laseczka zgorzeli gazowej (*Clostridium perfringens, Cl. septicum, Cl. novyi*), laseczka szelestnicy oraz leptospiry. Jak wynika z piśmiennictwa, również niektóre bakteriofagi posiadają przypuszczalnie właściwości wytwarzania hialuronidazy (Mondolfo cyt. za Gibianem, 1954 i Kjems 1957).

Nie stwierdzono obecności hialuronidazy u rodzajów: *Pasteurella, Haemophilus, Neisseria, Shigella*, u laseczki siennej, pałeczki okrężnicy, pałeczki duru rzekomego *A* i *B*, prątka gruźlicy i innych kwasoodpornych, *Rickettsia provazeki* oraz u *Entamoeba histolytica*.

W dostępnym piśmiennictwie znaleźliśmy jedną tylko pracę dotyczącą włoskowca różycy (Benko i Brudnjak 1953), w której autorzy przy zastosowaniu metody wiskozymetrycznej wykazali u badanych czterech szczepów włoskowca właściwość wytwarzania hialuronidazy. Według tych autorów właściwości enzymatyczne włoskowca mogą odgrywać rolę w patogenezie różycy, a w szczególności przy powstawaniu różycy stawów. W pracy tej jest ponadto cytowane doniesienie Romanelliego (1951), który stwierdził właściwość wytwarzania hialuronidazy u dwóch spośród pięciu szczepów włoskowca.

Zbyt mała ilość użytych w wymienionych pracach szczepów i zbyt ogólnikowe ich zbadanie wskazują na celowość bliższego poznania omawianego zagadnienia zarówno z punktu widzenia fizjologii zarazka, jak i patogennego znaczenia enzymu.

Niniejsza praca przedstawia pierwszą część zaplanowanego tematu, który obejmuje następujące zagadnienia:

1. Zbadanie większej ilości szczepów na ich właściwość wytwarzania hialuronidazy,
2. Wyświetlenie czy enzym jest pochodzenia wewnątrzkomórkowego czy zewnątrzkomórkowego,
3. Zbadanie jego wpływu na zjadliwość zarazka.
4. Zbadanie jego wpływu na jego właściwości immunogenne.

MATERIAŁ I METODA

Do badań używano terenowych szczepów włoskowca różycy otrzymanych z Zakładu Chorób Świń Instytutu Weterynarii. Hodowano je na bulionie mięsnym (*pH* 7,8-7,6) z dodatkiem 3% surowicy końskiej. Wstępne doświadczenia wykazały, że większą ilość hialuronidazy uzyskuje się przeważnie po 72-96 godzinach wylegania. Z tej przyczyny do właściwych badań używano 4-dniowe hodowle włoskowca inkubowane przy 37°. Poddawano je sączeniu przez sączek Seitza typu *K*, który w przeciwieństwie do typu *EK* nie adsorbuje enzymu na swej powierzchni. Przedmiotem badań był uzyskany przesącz.

Z kilku metod możliwych do zastosowania w naszych warunkach wybrano do badań metodę ACRA (Acid Congo Red Alcohol) podaną przez Burnetta (1948), która stanowi modyfikację metody MCP (Mucin Clot Prevention Test) opisaną przez McCleana i współpracowników (1943). Polega ona na zdolności hialuronidazy do depolimeryzowania kwasu hialuronowego. Kropla kwasu hialuronowego rzucona na kwaśny alkohol tworzy łatwo dostrzegalny skrzep. W przypadku, gdy wskutek działania enzymu kwas został zdepolimeryzowany, kropla rozpływa się.

Jako źródła kwasu hialuronowego stosowano bydlęcy płyn synowialny zawierający według Zabłockiego (1955) 20-25 mg % kwasu. Pobierano go strzykawką ze stawu nadgarstkowego bezpośrednio po uboju zwierzęcia i przechowywano pod toluenem w chłodni. Wartość płynu synowialnego zależna była od indywidualnych cech zwierzęcia, każdą więc próbkę bezpośrednio po pobraniu poddawano mianowaniu. Podobnym badaniom na wysokość miana poddawano regularnie co 3 dni próbki w okresie przechowywania, celem przekonania się o ewentualnych zmianach substratu. Przechowywany w tych warunkach płyn synowialny był przeważnie zdatny do użytku w ciągu miesiąca i dłużej.

MIANOWANIE KWASU HIALURONOWEGO W PŁYNIE SYNOWIALNYM

Z przygotowanych w postępie geometrycznym rozcieńczeń płynu synowialnego (począwszy od 1 : 10) w fizjologicznym roztworze chlorku sodu pobierano do probówek aglutynacyjnych po 0,5 ml płynu, ogrzewano w łaźni wodnej przy 37° w ciągu 1 godziny, szybko ochładzano,

dodawano po 0,1 ml wodnego roztworu czerwieni Kongo (0,5%) jako wskaźnika, po czym przy użyciu kapilary o wylocie średnicy 1 mm puszczano 1 kroplę z każdego rozcieńczenia z wysokości 1 cm na płytkę o średnicy 10 cm, zawierającą około 40 ml kwaśnego alkoholu (96 ml alkoholu z dodatkiem 4 ml 25-procentowego kwasu solnego). Zawarty

Fot. 1

w kropli kwas hialuronowy tworzył pod wpływem działania kwaśnego alkoholu niebiesko zabarwiony skrzep, którego kształt zależny był od stężenia względnie lepkości kwasu. Przy dużym stężeniu powstawał okrągły zbity skrzep zachowujący kształt kropli (fot. 1D). Przy mniejszych stężeniach formował się wyraźny pierścień (fot. 1B i C), a przy małych kropla nie tworzyła skrzepu, lecz rozpływała się w postaci bezkształtnej plamy (fot. 1A), Jako miano kwasu hialuronowego przyjmowano najwyższe rozcieńczenie płynu synowialnego, przy którym tworzył się jeszcze skrzep w postaci łatwo dającego się rozpoznać pierścienia. Do dalszych badań nad obecnością hialuronidazy stosowano płyn synowialny w rozcieńczeniu równającym się trzykrotnej wartości jego miana.

BADANIE OBECNOŚCI HIALURONIDAZY

Do szeregu probówek zawierających po 0,25 ml płynu synowialnego w odpowiednim rozcieńczeniu dodawano po 0,25 ml przesączu hodowli z rozcieńczeń w postępie geometrycznym. Po dokładnym wymieszaniu ogrzewano probówki w łaźni wodnej przy 37° w ciągu 1 godziny, następnie szybko ochładzano w wodzie z lodem w celu przerwania dalszego działania enzymu na substrat, po czym dodawano po 0,1 ml czerwieni Kongo i po 5 minutach przeprowadzano badanie w sposób po-

dany przy mianowaniu kwasu hialuronowego. Równocześnie nastawiano kontrolę samego kwasu, zastępując przesącz tą samą ilością roztworu soli. Jeśli kwas hialuronowy został przez enzym całkowicie zdepolimeryzowany, wówczas kropla rozpływała się (fot. 1A). Przy depolimeryzacji częściowej powstawał pierścień (fot. 1B i C), kwas zaś zdepolimeryzowany tworzył zbity skrzep (fot. 1D). Stopień depolimeryzacji kwasu zależny był od ilości enzymu w przesączu. Granicę ilości enzymu stanowi punkt końcowy przedstawiający najwyższe rozcieńczenie, przy którym brak było tworzenia się skrzepu w postaci pierścienia. Punkt końcowy wyrażony był zatem ilością przesączu w najwyższym rozcieńczeniu, które było w stanie całkowicie zdepolimeryzować kwas hialuronowy zawarty w 0,25 ml rozcieńczonego płynu synowialnego.

WYNIKI

Zbadano 74 szczepy włoskowca różycy wyosobnione z terenowych przypadków różycy świń. Wyniki wyrażone w najmniejszych ilościach przesączu 4-dniowej hodowli (punkt końcowy enzymu) przedstawione są w tabeli I.

Tabela I

Ilości hialuronidazy wytwarzane przez szczepy włoskowca różycy
Production of hyaluronidase by *Erysipelothrix rhusiopathiae*

Rozcieńczenie przesączu Dilution of culture filtrate	Najmniejsza ilość przesączu czynnego w ml The smallest amount of filtrate, showing the activity	Ilość szczepów Number of strains
1 : 1 - 1 : 20	0,25 - 0,0125	5 (7 %)
1 : 40	0,006	9 (12 %)
1 : 80	0,003	35 (47 %)
1 : 160	0,0015	15 (20,5 %)
Brak hialuronidazy No hyaluronidase		10 (13,5 %)

Wyniki wskazują, że włoskowce różycy wytwarzają hialuronidazę, jednak właściwość ta nie stanowi stałej cechy tego gatunku; istnieją ilościowe wahania w zawartości enzymu zależne być może od charakteru szczepu oraz podłoża wzrostu. U wielu szczepów (10-13,5%) nie wykazano przy zastosowaniu opisanej metody wytwarzania enzymu.

Dodatkowe badania 4-dniowej hodowli niezjadliwego włoskowca różycy szczepu Stauba, używanego w naszym kraju do produkcji szczepionki różycowej, wykazały, że nie wytwarza on hialuronidazy.

Należy zwrócić uwagę, że badania te umożliwiły nam jedynie jakościowe stwierdzenie obecności hialuronidazy, gdyż nie znając ilości kwasu hialuronowego obecnego w płynie synowialnym, nie byliśmy w stanie określić bliżej ilości hialuronidazy koniecznej do jego zdepolimeryzowania. Ilość zatem enzymu wyrażona w ustalonych jednostkach pozostaje nieznana. Stosując jednak tę samą ilość płynu synowialnego, który według przeprowadzonych kontrolnych badań nie uległ zmianie w ciągu całego przebiegu doświadczenia, można było porównać badane szczepy pod względem zdolności wytwarzania hialuronidazy i podzielić je na szczepy wytwarzające większą, mniejszą ilość tego enzymu oraz na szczepy nie wytwarzające go zupełnie.

WNIOSKI

Przy zastosowaniu metody ACRA stwierdzono u 64 spośród 74 terenowych szczepów włoskowca różycy właściwości wytwarzania hialuronidazy.

LITERATURA

Benko V., Brudnjak Z., 1953: Hijaluronidaza kod. *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Vet. Archiwa* **23**: 283.

Burnett F. M., 1948: The mucinase of *V. cholerae*. *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **26**: 71.

Duran-Reynals F., 1950: The groundsubstance of the mesenchyme and hyaluronidase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **52**: 973.

Gibian H., 1954: Das Hyaluronsäure-Hyaluronidase-System. *Enzymforsch.* **13**: 1.

Kjems E., 1957: Studies on streptococcal bacteriophages, 2. Adsorption, lysogenization and one step growth experiments. *Acta Path. Micr. Scand.* **42**: 56:

Kulonen E., 1951: Studies on hyaluronic acid and hyaluronidase in the animal organism. *Acta Phys. Scand.* **24** supp. **88**: 1.

McClean D., Rogers H. J., Willams B. W., 1943: Early diagnosis of wound infection. *Lancet* **244**: 355.

Meyer K., 1947: The biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase. *Physiol. Rev.* **27**: 335.

Meyer K., Rapport M. M., 1952: Hyaluronidases. *Adv. Enzymol.* **13**: 199.

Romanelli V., 1951: *Atti Soc. Italiana Sci. Vet.* **5**: 341.

Tolksdorf S., 1954: The *in vitro* determination of hyaluronidase. Methods of Biochemical Analysis **1**: 425.

Zabłocki B., 1948: Czynnik dyfuzyjny i jego znaczenie w medycynie.

Zabłocki B., 1955: Badania nad układem hialuronidaza-kwas hialuronowy.

M. Decowski and *T. Sozański*

PRODUCTION OF HYALURONIDASE BY *ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE*

Summary

74 field strains of *E. rhusiopathiae* were examined. The filtrates of 96 hours cultures were tested by A. C. R. A. test. 64 strains produced different amounts of hyaluronidase.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1958, 7, 209-219

J. Kamiński

WPŁYW SKŁADNIKÓW PODŁOŻA NA OZNACZANIE DROBNOUSTROJÓW W MLEKU

Z Katedry Mikrobiologii Wyższej Szkoły Rolniczej w Olsztynie

Wpłynęło dnia 10 lipca 1958 r.

Przy ocenie trwałości mleka spożywczego jedną z podstawowych analiz jest oznaczanie ogólnej ilości drobnoustrojów. Zagadnienie, jakie podłoża stosować, by uchwycić możliwie wszystkie drobnoustroje znajdujące się faktycznie w danej chwili w mleku, jest stale jeszcze otwarte, gdyż nie wszystkie gatunki rozwijają się na normalnie stosowanych podłożach.

Poszczególne pracownie mikrobiologiczne stosują do oznaczeń ilościowych klasyczną metodę płytkową, ale jakość stosowanych podłóż jest bardzo różna. Stąd też często uzyskiwane wyniki są nieporównywalne i mogą prowadzić do błędnych interpretacji.

Najczęściej stosowanym podłożem do oznaczeń ilościowych mikroflory mleka jest agar serwatkowy. Podłoże to daje wyższe oznaczenia ilościowe niż agar zwykły i jest uznane u nas za podłoże standardowe, zatwierdzone i stosowane w normach metodyki badań mleka (Ministerstwo Przemysłu Mięsnego i Mleczarskiego, 1957). Jednakże ukazujące się w literaturze zagranicznej prace na temat zamiany agaru serwatkowego podłożami dającymi znacznie wyższe wyniki wysiewów ilościowych skłoniły nas do podjęcia tego aktualnego tematu w Polsce.

Międzynarodowa Komisja do Spraw Standaryzacji Metod Badania Mleka (Grossley 1955) przyjęła w maju 1954 r. jako standardowe podłoże amerykański „Bacto Plate Count Agar 0479-02" firmy Difco, o składzie następującym:

ekstrakt drożdżowy	3,0 g
Bacto trypton	5,0 g
glikoza (d-glikoza)	1,0 g
agar	15,0 g
woda destylowana	1000,0 ml
$pH = 7{,}0 \mp 0{,}1$	

(Difco-Manual 1953).

Standard niemiecki, obowiązujący od 1955 r. w NRF, poleca stosowanie do oznaczeń ogólnej ilości drobnoustrojów w mleku i w produktach mleczarskich *FPL*-agaru, zawierającego:

ekstrakt mięsny Liebiga	3,0 g
sól kuchenna	5,0 g
pepton	10,0 g
laktoza DAB 6	10,0 g
agar	20,0 g
woda destylowana	1000 ml
1-procentowy wodny roztwór błękitu chińskiego	37,5 ml
$pH = 7,4 \pm 0,1$	

Demeter i współpracownicy (1956), przeprowadzając badania porównawcze z obydwoma tymi podłożami, stwierdzili, że przy wysiewie mleka surowego lub pasteryzowanego (71-74°) na agarze Difco uzyskuje się nieznacznie wyższe ilości kolonii aniżeli na agarze *FPL* (100-98,7). Występujące tu różnice ilościowe, w granicach 2-3,5%, są niewielkie i zasadniczo dopuszczalne w metodyce mikrobiologicznej. Inaczej jednak stosunki te układają się przy wysiewie mleka wysoko pasteryzowanego (powyżej 85°). Autorzy ci stwierdzili, że przy wysiewie na agar Difco uzyskuje się wyraźnie większe ilości kolonii, przy czym różnice te dochodzą nawet do 69,4% na niekorzyść agaru *FPL*. Zjawisko to tłumaczy Demeter stymulującym działaniem tryptonu w agarze Difco. Trypton, jako hydrolizat kazeiny, wpływa wybitnie na wzrost bakterii „wysoko pasteryzowanych", czyli bakterii ciepłoopornych, które mają specjalne wymagania odżywcze.

Do innych zupełnie wniosków dochodzi Godbersen (1956), który analizował wyniki serii analiz, obejmujących przeszło 10 000 próbek mleka, pasteryzowanych metodą wysokiej, krótkiej i niskiej pasteryzacji. Według tego autora, dla określenia bakteriologicznej ilości mleka spożywczego należy stosować zwykły, wolny od cukru, agar bulionowy.

W dalszych badaniach Godbersen, przeprowadzając analizy 164 próbek mleka (84 wysoko-, 68 krótko-, 12 długo-pasteryzowanego) przy zastosowaniu *FPL* agaru, agaru zwykłego i Difco, uzyskał zupełnie odmienne wyniki aniżeli Demeter i współpracownicy. Przyjmując wyniki na *FPL* za 100, podłoże Difco i agar zwykły dały ilości umieszczone w następującym zestawieniu:

Podłoże	Pasteryzacja		
	wysoka (85°)	krótka (71 - 74°40')	długa (62 - 65°30')
	ilość kolonii w %		
FPL	100	100	100
Difco	96	67,1	87
Agar zwykły	48	25,0	49,5

Wyniki Godbersena nie potwierdzają więc wyników Demetera i podważają wartość agaru Difco jako standardu porównaczego.

PRACA WŁASNA

Pracując nad zagadnieniem drobnoustrojów ciepłoopornych w mleku szukaliśmy podłoża, które dawałoby najlepsze wyniki przy oznaczaniu ilości tej grupy drobnoustrojów. W wyniku wielu prób spreparowaliśmy podłoże (agar nr 8), które w porównaniu z innymi dawało znacznie lepsze wyniki ilościowe. W szeregu analiz stwierdziliśmy dalej, że podłoże to jest doskonałym środowiskiem dla rozwoju nie tylko bakterii ciepłoopornych, ale również i dla innych mikroorganizmów mleka surowego. Często również w celu wzmocnienia wzrostu różnych szczepów bakteryjnych, sporadycznie tylko występujących w mleku, stosowaliśmy skosy agarowe z dodatkiem nowego podłoża; uzyskiwany wzrost był znacznie bujniejszy i następował szybciej aniżeli na normalnie stosowanych podłożach.

Obserwacje te skłoniły nas do zastosowania naszego nowego podłoża do ilościowego oznaczenia mikroflory mleka surowego i pasteryzowanego oraz do porównania wyników z wynikami otrzymywanymi na standardowym agarze niemieckim, agarze z błękitem chińskim wg Demetera, agarze zwykłym i serwatkowym. Standardu amerykańskiego nie mogliśmy zastosować z powodu niemożności uzyskania podłoża oryginalnego lub jego składników.

PŁYNY ROZCIEŃCZAJĄCE

Z uwagi na ogromną rolę płynów używanych do rozcieńczania materiału wysiewowego, przed przystąpieniem do właściwej pracy, przeprowadzono próby dotyczące wpływu różnych rozcieńczalników na uzyskiwane wyniki ilościowe. Zastosowano dwa rozcieńczalniki — roztwór fizjologiczny soli, jako najczęściej stosowany, oraz płyn Ringera (W i n k l e 1955) o następującym składzie:

Roztwór fizjologiczny soli		Płyn Ringera	
sól kuchenna	8,5 g	sól kuchenna	8,0 g
woda destylowana	1000 ml	chlorek potasu	0,2 g
		chlorek wapnia	0,2 g
		węglan dwuzasadowy	1,0 g
		woda destylowana	1000 ml

W celu uzyskania możliwie jak najmniejszych błędów metodycznych płyny do rozcieńczeń rozlewano w sposób jałowy dokładnie po 9 ml do jałowych buteleczek, przed samą analizą.

Buteleczki przed napełnieniem rozcieńczeń sterylizowano zamknięte watą, a po sterylizacji watę wymieniano korkami gumowymi, płukanymi uprzednio 1 godzinę w 65-procentowym alkoholu i przepalonymi. Tak przygotowane buteleczki przetrzymywano w temperaturze 105° przez 6 godzin. Przeprowadzona próba jałowości na 20 losowo wybranych buteleczkach dała wynik zadowalający.

Materiałem wysiewowym było mleko surowe. Jako pożywkę zastosowano agar serwatkowy (Demeter 1952). Do przygotowania rozcieńczeń stosowano pipety 1 ml, kalibrowane z dokładnością do 1/100 i sprawdzone.

Czas wylania rozcieńczeń na płytkę i zalania podłożem nie przekraczał 15 minut od chwili przygotowania rozcieńczenia. Płytki po wysiewie przetrzymywano 72 godziny w temperaturze 30°, po czym liczono.

Doświadczenie powtórzono w trzech seriach, stosując w każdej serii płyn Ringera i roztwór fizjologiczny, przy czym w każdej serii rozcieńczalnika wylewano 8 płytek równoległych. Różnice ilościowe między płytkami czyli przeciętne względne wahania obliczano ze wzoru (Demeter 1956):

$$t = \frac{\frac{x_i - \bar{x}}{\bar{x}}}{n} \cdot 100,$$

gdzie: t = przeciętne względne wahania, x_i = wartość jednostkowa (i = 1, 2, 3, ...), $x_i - \bar{x}$ = odchylenia od średniej arytmetycznej równolegle podejmowanych pomiarów, n = ogólna ilość pomiarów.

Uzyskane wyniki ujmuje tabela I.

W dalszych pracach stosowano więc już stale roztwór Ringera przy sporządzaniu rozcieńczeń do wysiewów ilościowych.

Wartość względnych relatywnych wahań t mieści się w przeprowadzonych wysiewach w granicach dopuszczalnych, z wyjątkiem jednego wysiewu (14,57). Przeciętne względne wahania w granicach 3-7 nie budzą z zasady żadnych zastrzeżeń. Taki błąd jest spotykany zawsze, przy

każdej ilościowej analizie mikrobiologicznej. Na wystąpienie różnicy międzypłytkowej wpływa wiele czynników, między innymi nierównomierne rozmieszczenie komórek w rozcieńczalniku, niezależne od pipetującego błędy w pipetowaniu, łączenie się komórek w konglomeraty itp.

Tabela I

Ilość bakterii w 1 ml mleka surowego przy stosowaniu do rozcieńczeń roztworu fizjologicznego i płynu Ringera (średnia z 8 powtórzeń, temperatura 30°, czas 72 godziny)

Viable count per 1 ml of milk. Dilution made with saline and Ringer's fluid (8 parallel experiments, incubation 30°, 72h)

Numer serii Series No	Roztwór Ringera — Ringer's fluid			Roztwór fizjologiczny soli — Saline		
	ilość na ml viable count	*t*	% wyrosłych kolonii p.c. of viable count	ilość na ml viable count	*t*	% wyrosłych kolonii p.c. of viable count
1	42 000 000	5,12	100	13 600 000	14,57	32,23
2	23 200 000	4,48	100	11 600 000	3,79	50,0
3	26 625 000	7,13	100	13 812 500	7,89	51,89

Różnica międzypłytkowa w pierwszej serii, wynosząca 14,57 w wypadku stosowania roztworu fizjologicznego soli, została spowodowana tym, że 2 płytki z ośmiu równoległych wykazały zbyt wielkie odchylenia ilościowe. Płytek tych jednak nie odrzucano; do obliczeń odchyleń brano wszystkie płytki bez względu na ilości wyrosłych kolonii.

PORÓWNAWCZE WYNIKI ILOŚCIOWE DROBNOUSTROJÓW W MLEKU PRZY ZASTOSOWANIU RÓŻNYCH PODŁOŻY

Po ustaleniu jakości rozcieńczalnika przystąpiono do badania wpływu różnych podłoży na wyniki ilościowe. Do badań zastosowano następujące podłoża:

agar serwatkowy (Demeter 1952),

agar *FPL* według standardu niemieckiego (1955),

agar z błękitem chińskim według Demetera (Demeter 1956).

agar bulionowy (Winkle 1955),

agar nr 8 (skład i sposób przygotowania podano na str. 217).

Produktem badanym było początkowo mleko surowe. Do rozcieńczeń stosowano płyn Ringera, bezpośrednio przed rozcieńczaniem odmierzany dokładnie po 9 ml do wyjałowionych buteleczek. Temperatura roztworu była jednakowa i wynosiła 20°.

Czas sporządzania wysiewu od wykonania rozcieńczenia do ukończenia wysiewu na płytce nie przekraczał 15 minut.

W celu ułatwienia pracy nie badano wszystkich podłoży jednocześnie, ale próby przeprowadzano seriami, eliminując do następnej serii podłoże dające najlepsze wyniki liczbowe i porównując je znów kolejno z następnym podłożem.

Tabela II

Ogólna ilość drobnoustrojów w 1 ml mleka surowego, oznaczana na agarze serwatkowym, agarze *FPL* i agarze z błękitem chińskim (średnia z sześciu powtórzeń w 30° po 72 godzinach)

Comparison of growth on three various media. Viable count per 1 ml of milk (6 parallel experiments, incubation — 30°, 72h)

	Agar serwatkowy Whey agar	Agar *FPL*	Agar według Demetera Demeter's agar
Ilość bakterii w tysiącach Viable count, thousands	11 500	16 100	15 400
Procent wzrostu na *FPL* Per cent of growth on *FPL*	71,42	100	95,66
t	3,19	2,9	2,38

W pierwszej serii doświadczeń zastosowano 3 podłoża: agar serwatkowy, agar *FPL* (standard niemiecki) i agar z błękitem chińskim według Demetera — najwyższe wyniki ilościowe w tej serii wysiewów otrzymano na agarze *FPL* (tabela II).

Tabela III

Ogólna ilość drobnoustrojów oznaczana na *FPL*-agarze i na agarze nr 8 (temperatura 30°, 72 godziny)

Comparison of *FPL* agar and agar no 8. Viable count per 1 ml of milk (incubation 30°, 72h)

	Agar *FPL*	Agar nr 8
Ilość bakterii w 1 ml w tysiącach Viable count per 1 ml in thousands	57 000	68 170
Procent wzrostu na agarze nr 8 Per cent of growth on agar no 8	83,61	100
t	2,93	3,02

Z kolei w serii drugiej (tab. III) porównano wyniki otrzymane na agarze *FPL* i na agarze nr 8 (nowe podłoże), eliminując agar nr 8 do następnej trzeciej serii (tab. IV), w której użyto dla porównania agaru zwykłego.

W rezultacie przy porównaniu wysiewów z mleka surowego najwyższe wyniki liczbowe otrzymano przy stosowaniu nowego podłoża nr 8, które dało o 16,4% więcej kolonii drobnoustrojów niż agar *FPL*.

Tabela IV

Ogólna ilość drobnoustrojów oznaczana na agarze nr 8 i na agarze bulionowym (temperatura 30°, 72 godziny)

Comparison of agar no 8. and broth agar. Viable count, per 1 of milk (incubation 30°, 72h)

	Agar nr 8	Agar bulionowy Broth agar
Ilość bakterii w 1 ml w tysiącach Viable count per 1 ml in thousands	7 883	5 583
Procent wzrostu na agarze nr 8 Per cent of growth on agar no 8	100	70,82
t	3,43	2,69

W dalszym toku pracy badano, czy podłoże to będzie również wykazywało swoją wyższość w przypadku badania mleka pasteryzowanego. W tym celu wysiewano mleko surowe, mleko pasteryzowane laboratoryjnie i mleko pasteryzowane przemysłowo. Wyniki ujęto w tabeli V.

Jak wynika z zestawienia wyników w tabeli V, mleko surowe dało na agarze serwatkowym 77%, na agarze *FPL* — 65%, na agarze z błękitem chińskim — 66%, na agarze zwykłym 52% ilości kolonii uzyskanych na agarze nr 8.

Mleko pasteryzowane laboratoryjnie dało 72% na agarze serwatkowym, 83% na agarze *FPL*, 85% na agarze z błękitem chińskim i na agarze zwykłym 75% ilości otrzymanej na agarze nr 8.

Wreszcie mleko pasteryzowane przemysłowo dało 86% na agarze serwatkowym, 78% na agarze *FPL*, 75% na agarze z błękitem chińskim i 71% na agarze zwykłym wyników ilościowych otrzymanych na agarze nr 8.

Zestawienia wykazują, że przy użyciu nowego podłoża (nr 8) uzyskano, niezależnie od typu badanego mleka, większe ilości kolonii aniżeli na pozostałych podłożach. Pozostałe podłoża: agar serwatkowy, agar *FPL*, agar według Demeterа — pod względem użyteczności niewiele różnią się między sobą. W znacznym zaś stopniu ustępują podłożu nowemu. Czynnikiem stymulującym rozwój bakterii na tym podłożu będzie prawdopodobnie, zgodnie z danymi Fostera (1952), hydrolizat kazeiny i wyciąg drożdżowy, umożliwiające rozwój pewnym gru-

pom bakteryjnym — zwłaszcza ciepłoopornym, normalnie nie rosnącym na pozostałych podłożach.

Tabela V

Ogólna ilość drobnoustrojów w 1 ml mleka, oznaczana na różnych podłożach, w tysiącach (średnia z 5 powtórzeń równoległych, w 30° po 72 godzinach)

Suitability of various media for bacteriological examination of raw and pasteurized milk (5 parallel experiments, incubation 30°, 72h)

Mleko Milk		Agar				
		serwatkowy whey	*FPL*	z błękitem chińskim China-blue	bulion broth	nr 8
Surowe Raw	ilość tysięcy viable count, thousands	52 000	43 600	44 800	34 980	67 000
	% wzrostu na agarze nr 8 p.c. of growth on agar no 8	77,60	65,07	66,86	52,22	100
	t	3,08	3,30	3,21	3,83	6,57
Pasteryzowane laboratoryjnie Pasteurized in laboratory	ilość tysięcy viable count, thousands	68,0	77,8	80,0	67,13	93,6
	% wzrostu na agarze nr 8 p.c. of growth on agar no 8	72,65	83,12	85,47	71,72	100
	t	1,47	6,99	8,93	2,69	6,28
Pasteryzowane przemysłowo Pasteurized in factory	Ilość tysięcy viable count, thousands	3 800	3 420	3 292	3 140	4,380
	% wzrostu na agarze nr 8 p.c. of growth on agar no 8	86,66	78,08	75,16	71,78	100
	t	7,58	5,15	4,80	9,93	5,11

W świetle uzyskanych wyników poważne zastrzeżenia budzą wnioski Godbersena — agar bulionowy nie powinien być stosowany do oznaczeń ogólnej ilości drobnoustrojów w mleku. W naszych badaniach podłoże to daje około 50% ilości drobnoustrojów przy wysiewie mleka surowego i 70% ich ilości w mleku pasteryzowanym.

PRZYGOTOWANIE PODŁOŻA-AGARU NR 8

Przygotowanie podłoża nie sprawia żadnych trudności i nie wymaga specjalnych preparatów zagranicznych. Skład i sposób przygotowania podajemy niżej.

Skład agaru nr 8

Bulion Winklego 300 ml
ekstrakt drożdżowy 80 ml
mleko hydrolizowane 50 ml
serwatka 200 ml
sól kuchenna 2 g
glikoza 10 g
laktoza 10 g
agar 20 g
woda destylowana do 1000 ml
$pH = 7{,}0 \mp 0{,}2$

Bulion (Winkle 1955):

500 g wolnego od żył i tłuszczu mięsa wołowego zemleć na maszynce, zalać 1000 ml wody destylowanej, wymieszać i pozostawić przez 2-3 godziny w chłodni. Następnie gotować przez 1 godzinę w pasteryzatorze, uzupełniając wyparowaną wodę, po czym sączyć przez bibułę. Do przesączu dodać 3,0 g soli kuchennej, 2,0 g fosforanu dwusodowego i 10,0 g peptonu Witte. Tak przygotowany roztwór pasteryzować przez 30 minut, sączyć. Zneutralizować ługiem sodowym do $pH = 7{,}8$ i wysterylizować w autoklawie przez 30 minut w temperaturze 120°.

Mleko hydrolizowane (Mašek 1946):

Mleko odtłuszczone podgrzewać kilka minut w 100°, ochłodzić do 40°, dodać 0,5% trypsyny, wymieszać i przetrzymać 4 godziny w temperaturze 37-40°. Dla lepszego trawienia należy stale utrzymywać *pH* 7,0. Po całkowitym przetrawieniu uzyskany mętny płyn należy podgrzewać do wrzenia, sączyć i nastawić *pH* na 7,0. Wyjałowić w autoklawie przez 30 minut w 120°.

Serwatka (Demeter 1952):

Do 400 ml serwatki podpuszczkowej dodać 1,5% NaCl i ogrzewać w autoklawie w celu wytrącenia albumin. Pozostawić przez 24 godziny w chłodni, po czym sączyć. Uzyskany przesącz zmieszać z 1100 ml wody destylowanej, dodać 12 g peptonu (Witte) i 2,0 g fosforanu sodu. Nastawić *pH* na 6,9 i ostrożnie sterylizować (0,6-0,7 atm).

Ekstrakt drożdżowy (Predtečenski 1953):

Prasowane drożdże rozkruszyć na drobne kawałki i wsypać do dużej butli. Butlę z drożdżami wstawić na 2 doby do termostatu (60°). Po ukończeniu autolizy dodać do butli potrójną, w stosunku do ciężaru początkowego drożdży, ilość wody wodociągowej. Rozcieńczony autolizat sterylizować w autoklawie w 1 atm przez 30 minut. Po sterylizacji pozostawić autolizat na kilka dni w chłodni celem odstania.

Bulion, ekstrakt drożdżowy, mleko hydrolizowane, serwatkę i sól zmieszać w kolbie i gotować 20 minut. Nastawić *pH* ługiem sodowym na 7,8, ponownie gotować 30 minut, po czym sączyć. Do przesączu dodać agaru uprzednio moczonego przez 12 godzin w wodzie destylowanej, przy minimum 3-krotnej zmianie wody i rozpuścić w pożywce. Po ostatecznym sączeniu dodać glikozę i laktozę, sprawdzić $pH = 7{,}0$. Wyjałowić w autoklawie przez 30 minut w 1 atm.

WNIOSKI

Omówione powyżej badania nad wpływem składników podłoża na oznaczanie ogólnej ilości drobnoustrojów w mleku spożywczym wykazały, że:

1. Wydaje się konieczne zastąpienie roztworu fizjologicznego soli, używanego do przygotowania rozcieńczeń mleka, płynem Ringera, Przy stosowaniu tego rozcieńczalnika uzyskuje się wyniki wyższe o około 50% w stosunku do uzyskanych przy roztworze fizjologicznym soli.

2. Podłoże nowe, agar nr 8, przygotowane w tutejszym Zakładzie wpływa stymulująco na rozwój bakterii mleka spożywczego i daje lepsze wyniki ilościowe aniżeli inne dotychczas stosowane podłoża.

3. Podłoże to nadaje się do oznaczania ogólnej ilości drobnoustrojów mleka tak surowego, jak i pasteryzowanego przy różnych temperaturach.

Dziękuję firmie „Bayer", Leverkusen NRF, za przesłanie mi ekstraktu mięsnego i błękitu chińskiego, niezbędnych do przygotowania podłoży, stosowanych w powyższej pracy.

LITERATURA

Crossley, 1955: Interimsbericht b. d. Sitzung d. Mikrobiol. Section d. Institut Kommision für Standardisierung d. Milch-Untersuchungsmethoden, Bonn, Sept., cyt. Demeter i inni, 1956.

Demeter K. J., 1952: Mikrobiologische Untersuchungsmethoden der Milchwirtschaft, E. Ulmer Verl., Stuttgart.

Demeter K. J., Buchmayer F. u. Faber A., 1956: Über den Einfluss unterschiedlich zusammengesetzter Agar-Nährböden auf das Keimzählergebniss bei verschiedenen Milchsorten, *XIV Intern. Milchwirtschaftskongress*, Roma, **3**: 78-86.

Difco., 1953: Manual of Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiological and Clinical Laboratory Procedures, Difco Laboratories, Detroit, Michigan.

Foster., 1952: *J. Dairy Sci.*, **35**; 988-997, cyt. według Demeter, 1956.

Festlegung von Standartmethoden auf dem Milchgebiet, 1955. *Milchwissenschaft*, **10** : 8.

Godbersen G., 1956: Die Bedeutung der Zusammensetzung des Nährbodens für die Bewertung des Keimgehaltes von Trinkmilch unter besonderer Berücksichtigung der verschiedenen Pasteurisierungsverfahren. *XIV Intern. Milchwirtschaftskongress*, Roma, **3/2**:116.

Mašek J., 1946: Mlékařská metodika. I. *Zkoušeni Mikrobiologická*, Praha.

Ministerstwo Przemysłu Spożywczego, 1957: Zbiór resortowych norm metodyki badań, **29**.

Predteczenski E. W., Borowska W. M., Margolina Ł. T., 1953: Metody badań laboratoryjnych, PZWL, Warszawa.

Winkle St., 1955: Mikrobiologische und Serologische Diagnostik, G. Fischer Verl., Stuttgart.

J. Kamiński

THE INFLUENCE OF MEDIUM ON VIABLE COUNT IN MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF MILK

Summary

A comparison was made of the viable count in milk after 3 days incubation at 30° on 5 different media: whey agar, broth agar, German standart *FPL*-agar, Demeter-agar and on our Laboratory medium (No 8).

The highest viable count in all kinds of milk tested was obtained on the medium No 8. Medium No 8 contained, beside the broth and whey, also the yeast extract and hydrolised milk. The preparation of this medium is not difficult and does not require foreign preparations difficult to get in our country.

Unfortunately, we were not able to compare medium No 8 with American medium „Plate Count Agar 0479-02" Difco.

An enormous influence on the viable count was exercised by the kind of dilution fluid used to prepare the milk dilutions.

The viable count, when Ringer fluid was used for dilutions, was by 100% higher than with the saline. It is the author's opinion that the Ringer-fluid should be used instead of the saline in routine microbiological examination of milk.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1958, 7, 221-235

J. Parnas i *T. Mierzejewski*

WYNIKI BADAŃ BIOCHEMICZNYCH I IMMUNOBIOLOGICZNYCH NAD *BRUCELLA BRUCEI*

Z Katedry Mikrobiologii Lekarskiej Akademii Medycznej i Zakładu Antropozoonoz Instytutu Medycyny Pracy i Higieny Wsi w Lublinie

Wpłynęło dnia 17 lipca 1958 r.

Nawiązując do ogłoszonych dotychczas prac immunochemicznych nad *Brucella* (P a r n a s i współpracownicy 1955, 1956 a, 1956 b) podajemy tu dalsze wyniki doświadczeń. Zmierzały one do zbadania frakcji chemicznych *Brucella* i określenia ich immunobiologicznej aktywności. Podobne badania wykonała D u b r o w s k a (1950, 1951, 1955).

METODA OTRZYMANIA FRAKCJI BIOCHEMICZNYCH

Do badań używano mieszaniny szczepów *Brucella brucei*, stosowanych przy wytwarzaniu bruceliny PD:

Brucella brucei v. melitensis M 16, *v. suis* (USA) *1330*, *v. bovis 24*, *v. bovis* (Dania) *260/A*, *v. bovis* (Dania) *260/D*, *v. bovis* (Anglia) *387/99*, *v. bovis* (USA) *S19*.

Bakterie hodowano we flaszkach Roux na podłożu agarowym, zawierającym 1% glikozy i 5% inaktywowanej surowicy końskiej o *pH* 6,6-6,8. W ten sposób uzyskiwano zawiesinę o gęstości 20 miliardów w 1 ml (w skali Browna).

Zawiesinę poddawano działaniu ultradźwięków, celem rozbicia komórek bakteryjnych (2800 kc/sek. w ciągu 90 minut w temperaturze do 37°). Stan rozbicia kontrolowano w mikroskopie elektronowym. Uzyskano osad, zawierający zbitą masę *Brucella* oraz płyn wolny od *Brucella*.

Do badania uzyskano 180 ml płynu o *pH* 7,55, koloru żółtozielonego, silnie załamującego światło. Lepkość w stosunku do wody nieznacznie zwiększona. Płyn zagęszczano pod próżnią nad alkoholem etylowym przy ciśnieniu 30 mm Hg w temperaturze 32-37° do objętości 100 ml. Zagęszczony płyn uległ częściowej peptyzacji, przybierając barwę zielonkawo-mleczną. Widoczne było bardzo silne zmętnienie.

Do schematu I:

Ekstrakcja I: 0,1 N CH_3COOH, w 16-18°, 10 dni oraz w 4° 3 dni, gotowanie przez 90 minut na wrzącej łaźni wodnej, po czym przetrzymywanie w —10° przez 3 dni i trzykrotne odmrażanie. Wirowanie.

Ekstrakcja II: Woda destylowana z dodatkiem 0,5 N HCl do *pH* 1,3-1,4, trzykrotne zamrażanie i odmrażanie, gotowanie przez 30 minut, wirowanie.

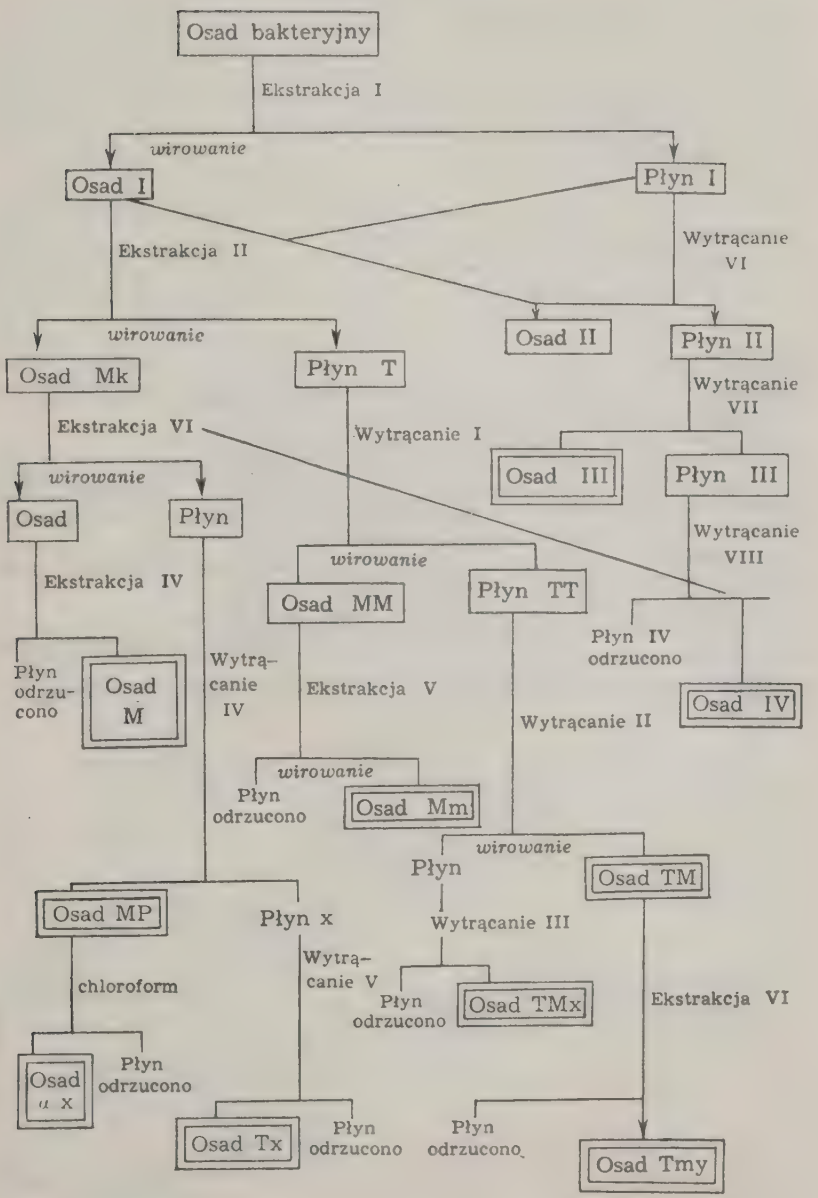
Ekstrakcja III: 9-procentowy fenol, temperatura pokojowa, 3 dni, wirowanie.

Ekstrakcja IV: Przemycie osadu pięciokrotnie bezwodnym alkoholem; aceton w temperaturze pokojowej, 4 dni.

Ekstrakcja V: Kwas pikrynowy, temperatura pokojowa, 72^h; wirowanie.

Ekstrakcja VI: Chloroform.

Schemat I


Osad bakteryjny
Ekstrakcja I
wirowanie
Osad I
Płyn I
Ekstrakcja II
Wytrącanie VI
wirowanie
Osad II
Płyn II
Osad Mk
Płyn T
Wytrącanie VII
Ekstrakcja VI
Wytrącanie I
Osad III
Płyn III
wirowanie
Osad
Płyn
Wytrącanie VIII
Ekstrakcja IV
wirowanie
Osad MM
Płyn TT
Płyn IV odrzucono
Płyn odrzucono
Osad M
Wytrącanie IV
Ekstrakcja V
Osad IV
Wytrącanie II
wirowanie
Płyn odrzucono
Osad Mm
wirowanie
Płyn
Osad TM
Osad MP
Płyn x
Wytrącanie III
chloroform
Wytrącanie V
Płyn odrzucono
Osad TMx
Ekstrakcja VI
Osad α x
Płyn odrzucono
Osad Tx
Płyn odrzucono
Płyn odrzucono
Osad Tmy

Do schematu II

Wytrącanie I: Trzykrotne zamrażanie (do —10°) i odtajanie, wirowanie.

Wytrącanie II: Dodanie 0,5 NaOH do *pH* 6.

Wytrącanie III: Alkohol absolutny i aceton (1 : 5).

Wytrącanie IV: Bezwodny alkohol (10 części na 1 część płynu), 24^h, zmieszanie z wodą destylowaną w stosunku 1 : 1, po 24^h dodawano 6 M NaOH (1 ml na 300 ml roztworu) i zostawiono na 48^h, wstrząśnięto i zostawiono na dalsze 72^h. Wirowanie, osad przemyto alkoholem, acetonem i eterem.

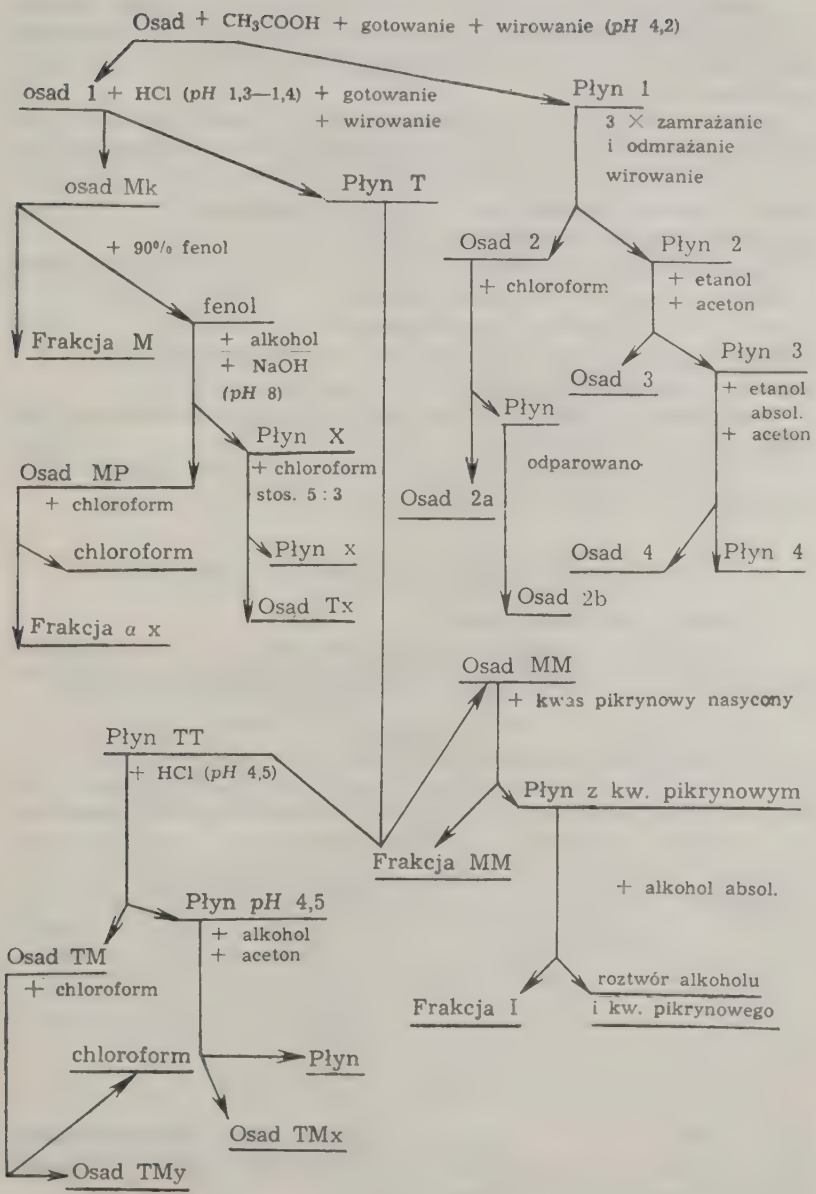
Wytrącanie V: Chloroform w stosunku 5 : 3, temperatura pokojowa, 5 dni, wirowanie, osad przemyto alkoholem, acetonem i eterem.

Wytrącanie VI: Trzykrotne zamrażanie i odtajanie, wirowanie.

Wytrącanie VII: Płyn zmieszano z alkoholem absolutnym i acetonem (8 : 22 : 2), 20°, 14 dni, wirowanie.

Wytrącanie VIII: Płyn zmieszano z alkoholem absolutnym i acetonem jak pod VII.

Schemat II


Osad + CH_3COOH + gotowanie + wirowanie (pH 4,2)
osad 1 + HCl (pH 1,3—1,4) + gotowanie + wirowanie
Płyn 1
3 × zamrażanie i odmrażanie wirowanie
osad Mk
Płyn T
+ 90% fenol
Osad 2
Płyn 2
+ chloroform
+ etanol
+ aceton
fenol
Frakcja M
+ alkohol
+ NaOH
(pH 8)
Osad 3
Płyn 3
+ etanol absol.
+ aceton
Płyn
Płyn X
+ chloroform stos. 5 : 3
odparowano
Osad MP
+ chloroform
Osad 2a
chloroform
Płyn x
Osad 4
Płyn 4
Frakcja a x
Osad Tx
Osad 2b
Osad MM
+ kwas pikrynowy nasycony
Płyn TT
+ HCl (pH 4,5)
Płyn z kw. pikrynowym
Frakcja MM
+ alkohol absol.
Płyn pH 4,5
+ alkohol
+ aceton
Osad TM
+ chloroform
roztwór alkoholu i kw. pikrynowego
Frakcja I
chloroform
Płyn
Osad TMx
Osad TMy

Zagęszczony płyn wirowano. Po wirowaniu otrzymano trzy warstwy: 1. na powierzchni substancję konsystencji galaretowatej, koloru kremowego (frakcja *Ix*), 2. płyn koloru żółtozielonego o *pH* 7,55, 3. osad koloru kremowego (frakcja *A*).

Płyn po odwirowaniu i oddzieleniu frakcji *Ix* oraz osadu z dna probówki doprowadzono do *pH* 4,5 przy pomocy 0,1 N HCl. Po zakwaszeniu wypadł osad frakcji *I*, który odwirowano. Płyn po usunięciu frakcji *I* zadano alkoholem absolutnym w stosunku objętościowym 1 : 5, a wytrącony osad oznaczono jako frakcję *B*.

Wszystkie frakcje odwodniono przy pomocy absolutnego alkoholu i acetonu, a następnie suszono pod próżnią.

W wyniku otrzymano ciała bezpostaciowe: frakcja *Ix* — proszek koloru kremowego, frakcja *I* — proszek koloru brunatnego, frakcja *A* — proszek koloru brunatnego, frakcja *B* — proszek biały.

Osad bakteryjny poddano następującym zabiegom chemicznym uwidocznionym na schemacie I.

W ten sposób otrzymane frakcje *Brucella* poddano badaniom immunobiologicznym na zwierzętach doświadczalnych.

WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE FRAKCJI *A*, *B*, *I*, *Ix*

a) Badanie jadowitości frakcji.

Po dwie świnki morskie szczepiono frakcjami *A*, *B*, *I* i *Ix* dootrzewnowo dawką 0,3 ml roztworu. Dwie myszki szczepiono również dootrzewnowo dawką 0,1 ml. U zwierząt nie spostrzegano objawów zatrucia. Świnki morskie nie gorączkowały. Frakcje *Brucella A*, *B*, *I* i *Ix* okazały się zatem niejadowite dla świnek i myszy.

Tabela I

Aktywność frakcji *I*, *Ix*, *A* i *B* w odczynie wiązania dopełniacza
The complement fixation test with fraction *I*, *Ix*, *A* and *B*

Frakcja Fraction	Surowica — Serum				
	nierozcieńczona undiluted	Rozcieńczenie — Dilution			
		1 : 5	1 : 10	1 : 20	1 : 40
I	+++	+++	+++	+++	+
Ix	+++	+++	+++	++	—
A	+++	+++	+++	+++	—
B	+++	+++	—	—	—

b) Badanie właściwości frakcji w odczynie wiązania dopełniacza.

Do odczynu wiązania dopełniacza użyto surowicy dodatniej w odczynie aglutynacji o mianie 1 : 800 oraz frakcji *I*, *Ix*, *A* i *B* w stanie rozcieńczonym 1 : 10. Surowicę rozcieńczono w mianie 1 : 1, 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40. Wyniki przedstawia tabela I.

Frakcja *I* jest najbardziej aktywna w odczynie wiązania dopełniacza. Frakcja *Ix* i *A* ustępują pod tym względem frakcji *I* tylko nieznacznie. Frakcja *B* jest najsłabsza.

Drugie doświadczenie polegało na zastosowaniu nierozcieńczonej surowicy odpornościowej oraz rozcieńczonej frakcji *I*, *Ix*, *A* i *B*. Wyniki przedstawiono w tabeli II.

Tabela II

Aktywność frakcji *I*, *Ix*, *A* i *B* w odczynie wiązania dopełniacza
Activity of various fractions in the complement fixation test

Frakcja Fraction	Stężenie frakcji — Concentrations of the fractions, %														
	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,19	0,1	0,05	0,025	0,012	0,006	0,003
I	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	–	–	–	–	–
Ix	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	–	–	–	–	
A	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	–	–	–	–	
B	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	–	–	–	–	

c) Badania właściwości antygenowych frakcji.

Królikom i świnkom morskim wprowadzono dożylnie, dootrzewnowo oraz podskórnie poszczególne frakcje w stanie nierozcieńczonym. Po upływie 3 tygodni badano u nich miano aglutynacji i obecność przeciwciał wiążących dopełniacz. Wyniki przedstawiono w tabeli III. Zaznaczają się tu różnice w sposobie reagowania na badane frakcje *Brucella* między królikami a świnkami morskimi. U królików zauważono dodatnie miana odczynu zlepnego (0-1/400), średnio ± 1/120. U 6 królików (na 8 badanych) odczyn wiązania dopełniacza wypadł dodatnio. Natomiast u 5 świnek morskich odczyny serologiczne wypadły całkowicie ujemnie, u 3 zaś — miano aglutynacji osiągnęło zaledwie 1 25, u 2 — znaleziono słabo dodatni odczyn wiązania dopełniacza, który powtórzony następnego dnia dał wynik ujemny. Wynik doświadczenia wskazuje na różnice w aktywności antygenowej, mierzonej u królików i świnek morskich. Frakcje nasze badane na królikach wykazały własności antygenów, natomiast wyniki badań u świnek morskich wskazywałyby raczej, że są to substancje haptenowe.

d) Własności alergenowe badanych frakcji.

Królikom uczulonym na brucelinę (6 tygodni wcześniej szczepionych

Tabela III

Antygenowe właściwości frakcji *I*, *Ix*, *A* i *B*
Antigenicity of the fractions *I*, *Ix*, *A* and *B*

Frakcja Fraction	Szczepienie 24.V. 1957 Immunisation 24 May 1957		Miano przeciwciał 18 dni po szczepieniu The level of antibodies 18 days after immunisation			
			aglutynacja 11. VI. 1957 agglutination, miano - titer		odczyn wiązania dopełniacza complement fixation	
	króliki rabbits	świnki morskie guinea pigs	króliki rabbits	świnki morskie guinea pigs	króliki rabbits	świnki morskie guinea pigs
I	i. v.	i. p.	1 : 50 ++	—	+++	—
I	s. c.	s. c.	1 : 50 ++	1 : 25++	++	—
Ix	i. v.	i. p.	—	—	—	—
Ix	s. c.	s. c.	1 : 200++	—	+++	—
A	i. v.	i. p.	1 : 400++	—	+++	—
A	s. c.	s. c.	1 : 25 ++	—	+	—
B	i. v.	i. p.	1 : 200++	1 : 25++	+++	+
B	s. c.	s. c.	1 : 100++	1 : 25+++	+++	+

i. v. — dożylnie — intravenous
s. c. — podskórnie — subcutaneous
i. p. — dootrzewnowo — intraperitoneous

Tabela IV

Własności alergenowe frakcji. Odczyn skórny Burneta
Activity of the fractions in allergic tests

Nr królika Rabbit No.	Frakcje – Fractions				Brucelina *PD*
	I	*Ix*	*A*	*B*	
1	+++				++
2		+++			+–
3			+–		+–
4				+++	++
5	—	—	—	—	+
Kontrolna Control	—	-	-	—	-

Brucella S 19) wprowadzono śródskórnie po 0,1 ml poszczególnych frakcji w rozcieńczeniu 1 : 10. Jako kontrolę dodatnią stosowano brucelinę *PD*. Królikom kontrolnym, nie szczepionym *S 19*, również wprowadzono badane alergeny.

Doświadczenie to powtórzono z podobnym wynikiem. Frakcje *I*, *Ix* i *B* wydają się więc silniejszymi alergenami niż brucelina *PD*.

WŁAŚCIWOŚCI IMMUNOBIOLOGICZNE FRAKCJI: *Tmy, 3, M, Mp, Tx, Tmx, ax, Mm, 4, Tm*

a) Badanie jadowitości frakcji.

Badanie to wykonano na 10 świnkach morskich i 10 myszkach, którym podawano podskórnie i dootrzewnowo 0,2 i 0,3 ml zawiesiny frakcji (10%). Żadne ze zwierząt nie wykazało objawów chorobowych. U świnek morskich nie zauważono wzrostu temperatury.

b) Badanie własności antygenowych frakcji (10% rozc.).

10 królików szczepiono 10 frakcjami (0,4 ml podskórnie i dwukrotnie po 0,1 ml śródskórnie). Po 7 i 9 dniach oraz po upływie 4 i 6 tygodni od szczepienia wykonano odczyn aglutynacji i wiązania dopełniacza. Wyniki przedstawiono w tabelach V, VI i VII. (Do odczynów użyto tu również — dla celów porównawczych — antygen *Pasteurella tularensae*).

Tabela V

Wpływ frakcji *Brucella* na występowanie przeciwciał
Effect of *Brucella* fractions on arising of antibodies

Króliki Nr Rabbits No.	Frakcje Fractions	Aglutynacja — Agglutination		Odczyn wiązania dopełniacza Complement fixation	
		Brucella	*Pasteurella*	*Brucella*	*Pasteurella*
21	*Tmy*	1/50 +	1/50 +	—	
22	*3*	1/50 +	1/200 +	++	
23	*M*	—	—	++	
24	*Mp*	—	—	+++	—
25	*Tx*	—	—	+++	
26	*Tmx*	—	—	+	—
27	*ax*	1/100 ++	1/3200 ++	++	++++
28	*Mm*	—	—	++	—
29	*4*	—	—	++	—
30	*Tm*	—	—	++	—

Tabela VI

Przeciwciała wywołane frakcjami *Brucella* badane powtórnie (patrz tab. V)

Antibodies caused by *Brucella* fractions, repeated test (see tab. V)

Króliki nr Rabbits no.	Frakcja Fraction	Z antygenem *Brucella*				
		Aglutynacja Agglutination			Odczyn wiązania dopełniacza Complement fixation	
		7 dzień 7 days	8 dzień 8 days	9 dzień 9 days	7 dzień 7 days	9 dzień 9 days
21	*Tmy*	—	1/25 ++	1/25 ++	+++	+++
22	*3*	1/100 ++	1/100 +++	1/50 +++	+++	++
23	*M*	—	—	—	+++	++
24	*Mp*			—	+++	—
25	*Tx*	1/50 +++	1/200 +++	1/200 +++	+++	++
26	*Tmx*	—	—	—	+++	++
27	*αx*	—	—	—	+++	++
28	*Mm*	—	1/25 +++	—	+++	—
29	*4*	—	1/50 ++	—	+++	—
30	*Tm*	—	1/50 ++	—	+++	++

Tabela VII

Przeciwciała wywołane frakcjami *Brucella* badane po raz trzeci (patrz tabele V i VI)

Antibodies caused by *Brucella* fractions third repetition (see tables V and VI)

Króliki nr Rabbits no.	Frakcja Fraction	Aglutynacja - Agglutination		Odczyn wiązania dopełniacza Complement fixation	
		Brucella	*Pasteurella*	*Brucella*	*Pasteurella*
21	*Tmy*	1/25 +	1/50 +++	—	—
22	*3*	—	1/50 ++	+++	++++
23	*M*	—	1/25 ++	+++	±
24	*Mp*	—	—	+++	—
25	*Tx*	—	1/25 +++	+++	±
26	*Tmx*	—	—	++	—
27	*αx*	—	—	++	—
28	*Mm*	—	—	++	—
29	*4*	—	—	++	—
30	*Tm*	—	—	+++	±

Tabela VIII

Badania porównawcze alergenów i frakcji *Brucella*
Comparative examinations of allergens and *Brucella* fractions

Króliki nr Rabbits no.	*PD* wet.	*PD* med.	*PE BA*	*Tmy*	*3*	*M*	*Mp*	*Tx*	*Tmx*	*ax*	*Mm*	*4*	*Tm*
1	++	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
2	++	+	—	+	++	—	—	—	—	—	—	—	—
3	+++	++	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	++	—	—	—	—	—	—	—	—
5	+++	+	++		++	—	—	—	—	—	—	—	—
6	+++	++	+	++	+	—	—	—	—	—	—	—	—
7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8	+	—	—	+	++	—	—	—	—	—	—	—	—
9	+++	+	—	+	++	—	—	—	—	—	—	—	—
10	++	++	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
11	+	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	±	—
12	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
13	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		—	—
14	+	±	—	—	±	—	—	—	—	—	—	—	—
15	+	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
16	++	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
17	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
18	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
19	+	±	—	—	—	—	—	—	±	—	—	—	—
20	++	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
21	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
22	++	+	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
23	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
24	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
25	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
26	+	±	±	±	±	—	—	—	—	—	—	—	—
29	++	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
30	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Tabela IX

Badanie porównawcze alergenów i frakcji *Brucella*

Comparative examination of allergens and *Brucella* fractions

Króliki nr Rabbits no.	*PD* zw.	*PD* l.	*M* w.	*M* l.	*Mirri*	*BA*	*PE BA*	*Mm*	*Tmy*	*4*	*x*	*Malbran*
1	++	+	+	—	—	+++	+	++	—	—	—	+
2									—	—		
3	+++	++	—	++	++	+++	—	+++	—	++	—	+
5	+++	++	+++	++	++	+++	++	—	—	—	—	+
6	+++	++	+++	—	++	+++	++	—	—	—	—	+
7	+++	++	+++	±	++	+++	++	++	—	—	—	+
8	+++	++	+	—	—	+++	++	—	—	—	—	±
10	+++	++	++	±	++	+++	++	—	—	—	—	+
11					—			—	—			—
12					—		—					
14					—			—				
15	++	++	—	—	—	++	++	—	—	—	—	±
16	+++	++	+	—	—	++	—	—	—	—	—	—
18	+++	++	+	—	—		—					
19	+++	+	—	—	—	+++	—	—	—	—	—	—
20	+++	++	+++	—	—	+++	++	—	—	—	—	+
21	+++	++	—	—	++	+++	++	—	—	—	—	+
22	+++	++	++	—	—	+++	++	—	—	—	—	±
24	+++	++	—	—	—	+++	++	—	—	—	—	+
25	++	+	—	—	—	+++	++	—	—	—	—	+
26	+++	++	—	—	—	+++	+	—	—	—	—	—
28	+++	+	—	—	—	+++	—	—	—	—	—	+
29	+++	++	—	—	—	+++	++	—	—	—	—	+
30	+++	++	—	—	—	+++	++	—	—	—	—	+
31	++	+	—	—	—	++	+	—	—	—	—	±
32	+++	++	—	—	—	++	++	—	—	—	—	±
33	+	±	nie badano			++	±	—	—	—	—	—
34	+++	++	—	—	—	+++	++	—	—	—	—	+
35				—	—			—	—	—	—	—

Legenda: *PD* zw. = Brucelina *PD* dla zwierząt, *PD* l. = Brucelina *PD* dla ludzi, *M.* w., *M* l. = Brucelina Mossimana dla zwierząt, dla ludzi.

W doświadczeniu przedstawionym w tabeli IX zbadano dodatkowo 5 królików zakażonych brucelozą (31, 32, 33, 34 i 35).

BADANIA ODCZYNU COOMBSA

U jednego królika szczepionego frakcją *Ix* odczyn Coombsa badany w 7 i 8 dniu był dodatni (równocześnie odczyn aglutynacji był ujemny). W innych badaniach odczyn był ujemny.

c) Badanie własności alergicznych 10 frakcji.

Badanie to wykonano na 30 królikach, z których 10 było uczulonych wyosobnionymi frakcjami, zaś 20 szczepem *Brucella S 19*.

Obok 10 frakcji zbadano tu także wartość porównawczą następujących alergenów:

Bruceliny *PD* (*ad usum vet.*), bruceliny *PD* (*ad usum humanum*), bruceliny *PEBA* * (Statens Vet. Institut Kopenhaga, Ottosen i Plum), melityny* (Instytut Pasteur, Paris), melityny* (Mirri, Italia), bruceliny ad usum vet. (Mossiman-Suisse), bruceliny Malbrau (Molinelli, Buenos Aires), bruceliny *ad usum humanum* * (Mossiman, Suisse), szczepionki *BA* żywej, niezjadliwej (Wiersziłowa *, Moskwa).

Brucelina *PEBA* i brucelina Mossimana to preparat chemiczno-alergenowy, bez-korpuskularny, nie wywołujący przeciwciał. Brucelina *Labpasteur* i melityna Mirri to przesącze hodowlane. Tabele VIII i IX przedstawiają wyniki badań porównawczych na królikach.

d) Badanie wskaźnika opsonofagocytowego.

U 10 królików szczepionych 10 frakcjami wykonano po 6 tygodniach od okresu szczepienia odczyn opsonofagocytowy z *Brucella* (metodą Huddlesona i metodą z dodatkiem autosurowicy inaktywowanej według Skurskiego). U wszystkich królików wskaźnik opsonofagocytowy był ujemny.

U 10 świnek morskich, na których próbowano jadowitość frakcji, wykonano również odczyn opsonofagocytowy po 6 tygodniach od chwili szczepienia frakcjami. Wyniki były ujemne przy zastosowaniu obu metod.

ANALIZA CHROMATOGRAFICZNA FRAKCJI POLISACHARYDOWEJ I BIAŁKOWEJ *BRUCELLA*

Ogłoszone wyniki badań chromatograficznych (Parnas i współpracownicy 1955, Parnas i Mierzejewski 1956 a, b) wykonano ponownie, używając tu szczepów wzorcowych *Brucella brucei*: odmiany *bovis* (*nr 24*), *suis* (*nr 1330*), *melitensis* (*M 16*), *S 19* i *PD*. Wyniki tych badań pokrywają się całkowicie z wynikami ogłoszonymi uprzednio (Parnas i Mierzejewski 1956 a).

* Serdecznie dziękujemy wymienionym instytucjom za udostępnienie nam odpowiednich preparatów.

WNIOSKI

1. Z pałeczek *Brucella* otrzymano szereg frakcji biochemicznych. Cztery z nich pochodziły z płynu, reszta zaś z osadu masy bakteryjnej po rozbiciu ultradźwiękami.

Wszystkie badane frakcje okazały się niejadowite dla białych myszek i świnek morskich. Frakcje pochodzące z płynu nad osadem masy bakteryjnej: *I*, *Ix*, *A* i *B* okazały się bardzo aktywne w odczynie wiązania dopełniacza. Rozcieńczenie frakcji do 0,1% nie wpływało na zahamowanie odczynu wiązania dopełniacza, co w porównaniu z innymi antygenami, np. bruceliną *PD* lub wyciągiem wodnym *Brucella* świadczy o dużej aktywności badanych frakcji. Frakcjami *I*, *Ix*, *A* i *B* szczepiono dożylnie i podskórnie króliki i świnki. U królików wystąpiły przeciwciała zlepne i wiążące dopełniacz. U świnek morskich stwierdzono jedynie przeciwciała zlepne w niskich mianach i to tylko po frakcji *I* i B. U królików uczulonych na alergen brucelozowy stwierdzono aktywność alergiczną frakcji *I*, *Ix* i *B*, większą niż bruceliny *PD*.

2. Podobne badania przeprowadzono z dalszymi 10 frakcjami, pochodzącymi z masy bakteryjnej osadu. Frakcje te okazały się mniej aktywne w odczynie wiązania dopełniacza od frakcji poprzednich. Porównując własności alergenowe tych frakcji z bruceliną *PD* oraz z zagranicznymi preparatami alergenowymi *Brucella* stwierdzono, że są to frakcje nieczynne lub bardzo słabo aktywne pod względem alergenowym.

3. Frakcje *I*, *Ix* i *B* mogą być z powodzeniem wprowadzone do alergiczno-skórnej diagnostyki brucelozy. Pozostałe frakcje nie będą miały praktycznego zastosowania w diagnostyce.

LITERATURA

Dubrowska I. I., Kajtmazowa E. J. i Tarchanowa I. O., 1955: O chemicznej naturze substancji posiadających własności alergiczne u wywoływaczy *Brucella*. *Biochimia*. **20** : 7.

Dubrowska I. I., 1950: Antygeny *Brucella suis*. *Biochimia*, **15** : 490.

Dubrowska I. I., 1951. Hydroliza antygenowego kompleksu *Brucella suis*. *Biochimia*. **16** : 41.

Parnas J., Mierzejewski T., Feltynowski A. i Łazuga K., 1955: Badania porównawcze nad właściwościami pałeczek *P. tularensis*, *P. multocida*, *P. rodentium* i *Brucella brucei*. *Annales UMCS*, *Sec. D.* **10**:27.

Parnas J. i Mierzejewski T., 1956a: Badania biochemiczne i immunochemiczne nad pałeczkami *Brucella*. *Acta Microbiol. Polon.* **5** : 353.

Parnas J. i Mierzejewski T., 1956b: Die bio- und immunochemischen Untersuchungen der *Brucella* Bakterien. *Zentr. Bakter. I, O*, **7/8** : 572.

J. Parnas and *T. Mierzejewski*

SOME BIOCHEMICAL AND IMMUNOBIOLOGICAL STUDIES ON *BRUCELLA BRUCEI*

Summary

From the bacterial mass of *Brucella* various biochemical fractions were obtained by extraction and precipitation (Scheme I).

HCl fractions were avirulent for white mice and guinea pigs.

Fractions *I*, *Ix*, *A* and *B* obtained from culture fluid were active in complement fixation test. They were also very active in allergic tests. Their antigenicity was shown in experiments on rabbits. The titer of antibodies in guinea pigs after the immunisation with fractions *I* and *B* was wery low.

Ten fractions isolated from bacterial cells were less active in serological and allergic tests.

The chemical analysis of isolated fractions gave results similar to those refered to in previous paper (Parnas and Mierzejewski 1956a).

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1958, 7, 237-244

J. Duda

WPŁYW ŚRODKÓW OWADOBÓJCZYCH *HCH* I *CHLORDANU* NA MIKROFLORĘ GLEBY

Z Katedry Mikrobiologii Rolnej Wyższej Szkoły Rolniczej w Poznaniu

Wpłynęło dnia 1 lipca 1958 r.

Stosowanie środków chemicznych do walki ze szkodnikami zwierzęcymi i grzybowymi roślin, jak również selektywnego niszczenia chwastów, nasuwa uzasadnione obawy ubocznego wpływu na zmniejszenie plonu, pogorszenie jego jakości, jak i naruszenie pewnej równowagi biocenotycznej w glebie.

Dla ostatecznej oceny wartości i przydatności preparatów chemicznych ważna jest znajomość ich wpływu na mikroflorę glebową, jako podstawowy czynnik kształtujący żyzność gleby.

Z nowych środków owadobójczych szczególnie skuteczny okazał się heksachlorocykloheksan (*HCH*) oraz oktochloro-metano-tetrahydrinden (*Chlordan*), z których pierwszy wprowadzono powszechnie do praktyki. Z badań autorów zagranicznych nad wpływem dawek owadobójczych *HCH* na procesy mikrobiologiczne (Smith i Wenzel 1946, 1948, Pochon i Lajudie 1948, Ryżkowa 1947) wynika, że preparat ten w dawkach owadobójczych nie zmienia ilościowo stanu mikroflory glebowej, nie działa toksycznie na chorobotwórcze bakterie roślin wyższych (Ryżkowa 1947). Inni autorzy (Bollen, Morrison i Crowell 1954 a, b) znajdowali zarówno hamujący jak i stymulujący wpływ *HCH* na rozwój i aktywność niektórych grup drobnoustrojów glebowych.

Nasze badania krajowe nad wpływem *HCH* i *Chlordanu* na mikroflorę gleby przeprowadzili Duda i Wróbel (Węgorek 1957) oraz nad wpływem samego *HCH* — Hauke-Pacewiczowa (1957). Wyniki tych badań są na ogół zgodne. Użyte ilości insektycydów (do 6,2 kg izomeru gamma *HCH* zawartego w najwyższej dawce 400 kg handlowego preparatu radzieckiego, oraz do 50 kg technicznego *Chlordanu* zawartego w 500 kg handlowego preparatu radzieckiego) nie wykazały żadnych istotnych zmian ilościowych i jakościowych w składzie mikroflory.

Według Hauke-Pacewiczowej wyższe dawki *HCH* (6 kg izomeru gamma *HCH*) mogą działać hamująco na wzrost azotobaktera, niższe natomiast stymulująco.

W pracy niniejszej przedstawiono wyniki doświadczeń laboratoryjnych nad wpływem obu preparatów na mikroflorę gleby. Ponadto badano wpływ wymienionych środków na aktywność niektórych procesów mikrobiologicznych.

BADANIA WŁASNE

Do badań użyto gleby piaszczysto-gliniastej z pola doświadczalnego Instytutu Ochrony Roślin w Poznaniu-Junikowie, na którym przeprowadzono badania opublikowane w pracy W ę g o r k a (1957). Gleby tej użyto do doświadczeń laboratoryjnych, badając wpływ różnych dawek obu preparatów na liczebność niektórych grup mikroflory, intensywność amonifikacji, intensywność oddychania oraz intensywność rozkładu błonnika.

Ponadto przeprowadzono doświadczenia nad wpływem badanych preparatów na aktywność wiązania wolnego azotu przez azotobaktera w hodowli laboratoryjnej oraz wzrost 9 różnych szczepów mikroorganizmów w czystej kulturze na pożywkach agarowych.

W badaniach użyto stosowany w praktyce preparat radziecki *HCH* zawierający 12% technicznego *HCH*, w skład którego wchodzi tylko 13% izomeru gamma *HCH*, oraz preparat radziecki *Chlordan*, zawierający 10% właściwego technicznego *Chlordanu*.

A. DOŚWIADCZENIE NAD WPŁYWEM RÓŻNYCH DAWEK *HCH* I *CHLORDANU* NA LICZEBNOŚĆ NIEKTÓRYCH GRUP DROBNOUSTROJÓW

Glebę przesianą przez sito rozważono w ilości po 1 g do krystalizatorów, wymieszano z odpowiednimi dawkami preparatów, ustalono wilgotność na 60% pełnej nasiąkliwości wodnej i umieszczono w termostacie przy 28°.

W doświadczeniu uwzględniono następujące kombinacje: kontrolna, 0,05 g. 0,10 g, 0,25 g, 1,00 g *Chlordanu* na 1 kg gleby.

Analogiczne doświadczenie przeprowadzono z *HCH*.

Na każdą kombinację przeznaczono 3 równoległe powtórzenia. Po 14 i 30 dniach analizowano wszystkie kombinacje metodą płytkową na: a) ogólną ilość bakterii, b) ilość form przetrwalnych, c) ilość promieniowców, d) ilość grzybów. Do wysiewów użyto pożywki agarowej o składzie: 200 ml wyciągu wodnego gleby, 0,5 g K_2HPO_4, 1 g NH_4NO_3, 2 g sacharozy, 800 ml wody wodociągowej. Kolonie liczono po 3 dniach hodowli w termostacie w 28°. Wyniki doświadczenia zestawiono w tabeli I.

Tabela I

Wpływ *HCH* i *Chlordanu* na ilość drobnoustrojów w glebie
Effect of *HCH* and *Chlordan* on the number of microorganisms in soil

Analizowane po dniach Incubation time	Preparat Insecticide	Dawki preparatu na 1 kg gleby Dosis per 1 kg of soil	Ogólna ilość mikroflory bakteryjnej w 10^6 na 1 g s. m. gleby Viable count x 10^6 per 1 g of soil	W tym In total viable count		Ogólna ilość grzybów w 10^3 na 1 g s. m. gleby Fungi, 10^3 per 1 g of soil
				form przetrwalnych % spores %	promieniowców % actinomycetes %	
14	*Chlordan*	0	27,5	4,5	26,2	78
		0,05 g	25,2	4,2	22,2	55
		0,10 g	26,1	4,2	24,1	64
		0,25 g	38,1	3,3	29,0	59
		1,00 g	30,3	4,5	38,0	60
30	*Chlordan*	0	20,2	10,3	31,0	88
		0,05 g	22,0	6,9	30,2	65
		0,10 g	17,7	9,2	28,4	65
		0,25 g	16,8	10,3	33,0	49
		1,00 g	18,0	9,0	31,9	61
14	*HCH*	0	14,9	6,9	47,3	42
		0,05 g	17,6	5,3	45,1	34
		0,10 g	15,9	6,7	51,2	31
		0,25 g	15,4	9,3	49,5	34
		1,00 g	17,2	5,5	48,8	34
30	*HCH*	0	9,9	6,9	61,3	21
		0,05 g	10,5	10,1	64,1	23
		0,10 g	10,4	6,2	63,7	20
		0,25 g	8,5	5,6	60,3	21
		1,00 g	10,7	6,0	59,0	24

B. AMONIFIKACJA

25 g świeżej gleby przesianej oraz odpowiednią ilość preparatu mieszano dokładnie z 0,45 g peptonu, próbkę umieszczano w płytce Petriego, po czym przetrzymywano przez 4 dni w termostacie przy stałej temperaturze 28°. Następnie oznaczano dystylacją próżniową metodą Parnasa ogólną ilość amoniaku w próbce. Aktywność amonifikacji wyrażano w procentach zamonifikowanego azotu peptonowego po 4 dniach inkubacji (tabela II).

Tabela II

Wpływ *HCH* i *Chlordanu* na aktywność amonifikacji
Effect of *HCH* and *Chlordan* on the ammonification in soil

Preparat Insecticide	Wielkość dawki na 1 kg gleby w g Dosis, grams per 1 kg of soil	% zamonifikowanego azotu peptonowego N from peptone, ammonification per cent
	0,0	46,5
	0,05	50,8
HCH	0,10	49,8
	0,25	54,2
	1,00	48,5
	0	46,5
	0,05	48,7
Chlordan	0,10	48,0
	0,25	47,0
	1,00	52,0

C. ODDYCHANIE

Doświadczenie przeprowadzono w aparacie zbudowanym na zasadzie aparatu Warburga. Do doświadczenia użyto próbki gleby o wilgotności równej 60% pełnej nasiąkliwości wodnej. Ilość wydzielonego dwutlenku węgla obliczano po 2, 5 i 18 dniach. Doświadczenie przeprowadzono w 3 równoległych powtórzeniach. Ze względu na ograniczoną ilość manometrów w doświadczeniu uwzględniono tylko 2 najwyższe dawki preparatów. Wyniki zestawiono w tabeli III.

Tabela III

Wpływ *HCH* i *Chlordanu* na oddychanie gleby
Effect of *HCH* and *Chlordan* on CO_2 production in soil

Preparat Insecticide	Wielkość dawki na 1 kg gleby w g Dosis, grams per 1 kg of soil	Ilość wydzielonego CO_2 w ml po: Amount of produced CO_2 in soil after: 2 dniach 2 days	5 dniach 5 days	18 dniach 18 days
	0,0	8,45	13,74	19,59
HCH	0,25	8,06	13,61	19,51
	1,00	3,86	5,46	11,50
	0,0	8,45	13,74	19,59
Chlordan	0,25	8,18	13,54	18,64
	1,00	7,60	12,75	18,79

D. ROZKŁAD BŁONNIKA

Próbki gleby o ustalonej wilgotności 60% pełnej nasiąkliwości wodnej wymieszane z dawkami preparatu tej samej wielkości, jak w doświadczeniach poprzednich, umieszczano w płytkach Petriego. Na dnie każdej płytki umieszczano dwa pasemka bibuły filtracyjnej. Próbki przetrzymywano w termostacie w 28°. Obserwacje rozkładu błonnika przeprowadzano w ciągu 20 dni.

Obserwacje wykazały, że dawki do 0,25 g obu preparatów na 1 kg gleby nie spowodowały żadnych różnic w intensywności rozkładu błonnika w porównaniu z szeregiem kontrolnym. Najwyższa dawka obu preparatów (1 g na 1 kg gleby) zahamowała wyraźnie rozkład błonnika.

E. WIĄZANIE WOLNEGO AZOTU PRZEZ AZOTOBAKTERA

Doświadczenie przeprowadzono w następujący sposób: Pożywkę sacharozową dla azotobaktera rozlano po 100 ml do kolb Erlenmajera o pojemności 750 ml. Do poszczególnych kombinacji dodano odpowiednie dawki preparatów, szczepiono zawiesiną kultury azotobaktera i hodowano przez 4 dni w termostacie trzęsawkowym (D u d a 1957). Azot ogólny oznaczano metodą Kjeldahla. Po ukończeniu doświadczenia obliczono gęstość komórek w hodowli, posługując się w tym celu komorą Thoma. Doświadczenie przeprowadzono na dwóch różnych szczepach azotobaktera. Wyniki doświadczenia zebrano w tabeli IV.

Tabela IV

Wpływ *HCH* i *Chlordanu* na intensywność wiązania wolnego azotu przez azotobaktera

Effect of *HCH* and *Chlordan* on the nitrogen fixation by *Azotobacter*

Preparat Insecticide	Wielkość dawki w mg/1 ml pożywki Dosis, mg per ml of medium	Ilość związanego N_2 na 1 g sacharozy w mg N_2 fixed, mg per 1 g of saccharose utilized		Ilość komórek w 1 ml hodowli × 10^6 Number of *Azotobacter* cells per 1 ml of culture in 10^6	
		szczep I strain I	szczep II strain II	szczep I strain I	szczep II strain II
Kontrola Control	0	9,60	12,40	584	708
HCH	1 mg	9,10	11,40	520	640
	0,5 mg	9,40	12,85	595	680
	0,1 mg	9,55	12,15	560	670
Chlordan	1 mg	8,55	11,00	570	655
	0,5 mg	8,70	11,50	620	670
	6,1 mg	9,25	11,65	590	710

F. WZROST NIEKTORYCH DROBNOUSTROJÓW NA PODŁOŻU AGAROWYM PRZY RÓŻNYCH DAWKACH *HCH* I *CHLORDANU*

Zaszczepiono rysowo na odpowiednie podłoże agarowe z różnymi dawkami preparatów 11 szczepów bakterii i grzybów. W doświadczeniu uwzględniono następujące gatunki: *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Sarcina lutea*, *Rhizobium lupini*, *Rhizobium meliloti*, *Streptomyces griseus*, *Mucur sp.*, *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.* Dla poszczególnych kultur użyto pożywek: dla *B. mycoides*, *B. subtilis* i *E. coli* podłoże *MPA*, dla *Sarcina lutea* oraz grzybów — agar brzeczkowy, dla azotobaktera — agar sacharazowy, dla *Streptomyces griseus* — agar ziemniaczany. Ocenę wzrostu prowadzono codziennie do 5 dnia włącznie. Wyniki końcowe oceny przedstawia tabela V.

Tabela V

Wpływ *HCH* i *Chlordanu* na wzrost niektórych drobnoustrojów na podłożu agarowym

Effect of *HCH* and *Chlordan* on the growth of some soil microorganisms on an agar medium

Gatunek Microorganism	Kontrola Control	Wielkość dawki preparatu na 1 ml podłoża w mg Dosis of insecticide, mg per 1 ml of an agar medium							
		HCH				*Chlordan*			
		1	0,5	0,1	0,05	1	0,5	0,5	0,05
Azotobacter	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
B. mycoides	++++	0	+	++++	++++	0	+	++++	++++
B. subtilis	++++	0	+	++++	++++	0	++	++++	++++
E. coli	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Sarcina lutea	++++	0	+	++	++++	0	+	++++	++++
S. griseus	++++	+	++++	++++	++++	+	++++	++++	++++
Rhizobium lupini	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Rhizobium meliloti	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Mucur sp.	++++	+	++	++++	++++	+	++	++++	++++
Aspergillus niger	++++	++	+++	++++	++++	+	++	++++	++++
Penicillium sp.	++++	++	+++	++++	++++	+	++	++++	++++

0 — brak wzrostu, no growth
\+ — ślad wzrostu, trace of growth
++ — wzrost słaby, slight growth
— wzrost średni, medium growth
— wzrost dobry, abundant growth

OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Doświadczenia nad wpływem obu badanych preparatów na liczebność mikroflory glebowej i jej aktywność w warunkach laboratoryjnych nie uwzględniały wpływu warunków klimatycznych i ekologicznych.

które w doświadczeniach polowych mogą znacznie zmieniać wyniki analiz mikrobiologicznych. W doświadczeniach niniejszych zastosowano ponadto również dawki znacznie większe od największych dawek preparatów stosowanych w praktyce rolniczej. Najwyższa dawka obu preparatów stosowana w niniejszych doświadczeniach jest około 6 razy większa niż maksymalne dawki, używane w eksperymentach polowych. Pomimo tak znacznego zwiększenia ilości preparatu wyniki doświadczenia (tabela I) wskazują na całkowity brak wpływu na ilość mikroflory glebowej.

Najwyższa dawka *HCH* hamowała początkowo wydzielanie CO_2 przez glebę, natomiast *Chlordan* oraz pozostałe dawki *HCH* nie powodowały żadnych istotnych zmian w produkcji CO_2. Brak wpływu na aktywność fizjologiczną bakterii potwierdzają również wyniki doświadczenia nad amonifikacją (tabela II) oraz rozkładem celulozy.

Stwierdzono również, że oba preparaty nie wpływają na intensywność wiązania wolnego azotu oraz na liczebność azotobaktera w hodowlach płynnych i stałych.

Bardzo wysokie dawki (1 g i 0,5 g na 1 ml podłoża agarowego) hamują wzrost *B. subtilis*, *B. mycoides*, *Sarcina lutea* oraz w mniejszym stopniu niektórych grzybów w czystych kulturach agarowych. Charakterystyczne, że nie zareagowały nawet na największe dawki ani azotobakter ani *Rhizobium*. Stwierdzono natomiast, że dawki odpowiadające stosowanym w praktyce rolniczej (dawki — 0,1g/1kg gleby) nie wpływają w ogóle na wzrost bakterii testowych.

Wszystkie powyższe dane wskazują na to, że owadobójcze preparaty w stężeniach stosowanych w praktyce nie wywierają widocznego wpływu na stan i aktywność podstawowych grup drobnoustrojów glebowych. Niewątpliwie jednak środki te, ze względu na ich selektywny charakter owadobójczy, w znacznym stopniu mogą zakłócać rozwój mezofauny glebowej. Nie przeprowadzono również dotychczas badań nad ich wpływem na mikrofaunę oraz mikroflorę zieloną gleby. Środki te mogą wywierać również znaczny wpływ na kształtowanie się zespołów rizosfery korzeniowej w wypadku wyraźnego działania hamującego bądź stymulującego na rozwój roślin uprawnych. Z faktu braku wpływu na mikroflorę typu saprofitycznego nie wynika zatem, że środki te są całkowicie obojętne dla mikrocenozy glebowej, a pośrednio dla żyzności gleby.

Za udzieloną pomoc przy wykonaniu analiz mikrobiologicznych dziękuję serdecznie koleżankom mgr Z. Pędziwilkowej i mgr E. Malińskiej.

LITERATURA

Bollen W. B., Morrison H. E. i Crowell H., 1954a: Effect of field treatments of insecticides on numbers of bacteria, streptomyces and moulds in the soil. *J. Econom. Entomol.* **47** : 302.

Bollen W. B., Morrison H. E., i Crowell H., 1954b: Effect of field and laboratory treatments with *BHC* and *DDT* on nitrogen transformations and soil respiration. *J. Econom. Entomol.*, **47** : 307.

Duda J., 1956: Zastosowanie metody głębinowej w hodowli azotobaktera. *Acta Microbiol. Polon.*, **5** : 113.

Hauke-Pacewiczowa T., 1957: Wpływ środka owadobójczego *HCH* na mikroflorę gleby. *Roczn. Nauk Roln.*, **76-A-4** : 641.

Pochon J. i Lajudie O., 1948: *Compt. rend.* 226 : 2091 (według T. Hauke-Pacewiczowa, 1957: *Roczn. Nauk Roln.* 76, A-4 : 641).

Ryżkowa A. S., 1947: Bakteriocidnost geksachłorana. *Dokłady WASCHNIL*, **3** : 17.

Smith N. R. i Wenzel M. E., 1947: *Proc. Soil Sci. Amer.* **12** : 227 (według Hauke-Pacewiczowa T.; 1957: *Roczn. Nauk Roln.* **76** : A-4 : 641).

Węgorek W., 1957: Wpływ preparatów *HCH* i *Chlordanu* na rośliny i mikroflorę glebową. *Roczn. Nauk Roln.*, **74** : A-2 : 373.

J. Duda

EFFECT OF INSECTICIDES *HCH* AND *CHLORDAN* ON SOIL MICROFLORA

Summary

The effect of the insecticides, *HCH* and *Chlordan* (USSR production) on soil microflora was studied in laboratory experiments.

In pot experiments the total numbers of bacteria, of bacterial spores, of actinomycetes and of fungi were examined during prolonged incubation in the presence of various doses of insecticides (table I). No inhibitory influence of these preparations could be found.

The insecticides in concentrations used in agricultural practice have no detrimental effect on the ammonification and CO_2-production of soil (tables II and III), on cellulose decomposition and on the growth and nitrogen fixation by *Azotobacter* (table IV).

The growth of some soil microorganisms in pure agar cultures in the presence of the examined insecticides was observed. No influence on the growth of tested microorganisms was noted. Only the very high concentrations inhibited the growth of B. *subtilis*, *B. mycoides*, *E. coli* and to some extent of *Penicillium sp.*, *Mucor sp.* and *Aspergillus niger* (table V).

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1958, 7, 245-248

Z. Rębowska

WSTĘPNE BADANIA NAD WIRUSEM MOZAIKI TYTONIOWEJ (*TMV*) NA POMIDORACH

Komunikat

Z Pracowni Fizjologii Żywienia Roślin IUNG w Puławach

Wpłynęło dnia 2 maja 1958 r.

Badania nad wirusem *TMV* w Pracowni Fizjologii Żywienia Roślin IUNG w Puławach prowadzono w latach 1956-1957. Celem badań było wykazanie:

A. Współzależności pomiędzy występowaniem i stopniem natężenia infekcji *TMV* a czynnikami zewnętrznymi i odżywianiem pomidorów.

B. Zmian biochemicznych zachodzących w tych roślinach pod wpływem porażenia wirusem *TMV*.

W szczególności badano wpływ: 1. przyswajalnego Mn, 2. azotu pochodzącego z różnych źródeł, a mianowicie: a) z gnojówki, b) z obornika, c) z $Ca(NO_3)_2$ na rozwój wirusa *TMV* i rozwój roślin.

Doświadczenie było przeprowadzane w hali wegetacyjnej w wazonach typu Mitscherlicha o pojemności 10 kg piasku. Jako podstawowe nawożenie przyjęto pożywkę Carsten-Olsen (*Phisiologia Plantarum* 1950: 3 : 2) z dawką 500 mg N na 10 kg piasku. Badania przeprowadzano na pomidorach, odmiany Karzełek Puławski. Rośliny zakażono w stadium 4 liści drogą inokulacji pyłem tytoniowym, przy pomocy karborundu (pył tytoniowy pochodził z liści tytoniu chorego na *TMV*).

W trakcie rozwoju roślin prowadzono badania biochemiczne i to zarówno na roślinach zdrowych, jak i zakażonych *TMV*. Oznaczano:

1. Oddychanie w liściach metodą manometryczną w aparacie Warburga,

2. Katalazę w liściach metodą manometryczną, w aparacie Warburga.

3. Zawartość witaminu *C* w owocach dojrzałych według Joszta i Nowotnego (*Roczn. Nauk Roln.*, 1949: 3).

4. Sumę cukrów i cukry redukujące w owocach dojrzałych i liściach, metodą Bertranda.

W czasie prowadzenia doświadczeń obserwowano przebieg porażenia roślin zainfekowanych wirusem *TMV*.

Stwierdzono, że od momentu zakażenia pomidorów wirusem *TMV* do momentu wystąpienia pierwszych objawów, okres „utajonego" rozwoju wirusa trwał od 10 do 15 dni w zależności od: 1) wieku rośliny w momencie szczepienia, 2) wpływu czynników zewnętrznych, jak temperatura, wilgotność, nasłonecznienie w okresie utajonego rozwoju. W latach następnych zamierzamy zwrócić uwagę na te czynniki. Stwierdzono bowiem, jak podaje Siemaszko (1957), że temperatura 37,5-38° może już inaktywować niektóre wirusy w tkankach zarażonych roślin, a przez to utrudnia i sam proces zarażenia.

Poza tym cytowany przez Siemaszko Leontjew wykazał, że rośliny łatwiej podlegały infekcji i silniej reagowały na infekcję w zimie, chociaż koncentracja wirusa typu mozaiki w tkankach żywiciela była w tym czasie 10-krotnie mniejsza niż w lecie. W badaniach naszych, gdy zakażeniu podlegał młody, lecz już wykształcony pierwszy i drugi liść, a cała roślina była w stadium czterech liści, objawy porażenia występowały kolejno na wszystkich liściach z pominięciem liścia trzeciego i czwartego, które były zawsze wolne od zewnętrznych objawów chorobowych.

Podobne wyniki otrzymano w Zakładzie Botaniki WSR w Krakowie pod kierunkiem prof. dr A. Kozłowskiej z wirusem *X* na tytoniu (według ustnej informacji z 1956 r.).

Zaobserwowano również, że przy zakażeniu roślin przez liście szybciej występują objawy *TMV* niż przy zakażeniu ich przez korzenie, wówczas, gdy rośliny znajdują się w tym samym stadium rozwoju. (Obserwacje te przeprowadzono na pomidorach uprawianych w kulturach wodnych, na pożywce Carsten-Olsen).

Możliwe, że zjawisko to zależy od ruchu wirusa w roślinie. Samuel (1934) np. zauważył, że z zakażonego liścia wirus przechodzi najpierw z asymilatami do korzenia, skąd następnie przechodzi wraz z pokarmami do stożka łodygi i do poszczególnych liści. Poza tym Siemaszko (1957) podaje, powołując się na Jonson i Hoggan, że wirus ten ginie bardzo szybko, jeżeli znajdzie się w glebie o bogatej mikroflorze, natomiast w tej samej ziemi wysterylizowanej może utrzymać się znacznie dłużej, nie tracąc własności patogennych.

Możliwe, że w wypadku naszego doświadczenia na opóźnienie występowania *TMV* na liściach miały wpływ wydzieliny korzeniowe, czy też może wpływały one na osłabienie wirulencji wirusa. Problemem tym mamy zamiar zająć się w następnych badaniach.

Z badań nad współzależnością między występowaniem *TMV* a metabolizmem manganowym w pomidorach okazało się, że rośliny zasilane

optymalną dawką przyswajalnego manganu szybciej i silniej podlegały infekcji *TMV* niż rośliny uprawiane w takich samych warunkach, ale pozbawione Mn w środowisku odżywczym. W trakcie tych badań zaobserwowano, że mozaika charakterystyczna dla roślin pozbawionych manganu i mozaika wywołana przez wirus *TMV* mogą występować obok siebie na liściu. Obie jednak są bardzo typowe i łatwe do odróżnienia. Liście rośliny cierpiącej na brak Mn żółkną, zieleń utrzymuje się tylko po obu stronach nerwu, w rezultacie czego otrzymuje się delikatną zieloną siateczkę na tle jaśniejszej blaszki liściowej.

Mozaika tytoniowa natomiast objawia się na liściach pomidorów występowaniem zielonych, nieregularnych plamek, chaotycznie rozrzuconych po całym liściu, przy czym plamki te są ciemniejsze od barwy samego liścia.

Te orientacyjne wyniki świadczą o innym przebiegu przemiany materii w pomidorach chorych, zakażonych wirusem *TMV*, niż w roślinach nie zakażonych, ale pozbawionych Mn w pożywce. Bliższe wyjaśnienie tego zagadnienia będzie tematem naszych późniejszych badań.

W dotychczasowych badaniach nad wpływem azotu pochodzącego z różnych źródeł (z gnojówki, obornika, $Ca(NO_3)_2$) na rozwój wirusa *TMV* i rozwój porażonej rośliny, stwierdzono ujemny wpływ wirusa niezależnie jednak od rodzaju nawożenia azotowego. Wszystkie rośliny zakażone rozwijały się słabiej, później wchodziły w okres kwitnienia, później też dojrzewały owoce. W rezultacie rośliny kontrolne dały wyższy plon owoców dojrzałych niż rośliny porażone *TMV*.

Przeprowadzone analizy wykazały różnice w oddychaniu roślin, a mianowicie rośliny zakażone oddychały intensywniej niż rośliny zdrowe. Aktywność katalazy natomiast była mniejsza w tkankach roślin chorych niż zdrowych.

Nie stwierdzono różnic w zawartości cukrów (całkowitej jak i redukujących) w liściach i dojrzałych owocach roślin zdrowych i porażonych. Podobne wyniki otrzymali W a t s o n i W a t s o n (1951), badając wpływ porażenia liści buraków cukrowych wirusem mozaiki na zawartość i przemieszczenie cukrów.

Stwierdzono natomiast większą procentową zawartość witaminu C w owocach roślin chorych niż zdrowych.

Wyżej opisane doświadczenia były w ciągu okresu wegetacyjnego zakładane tylko raz i prowadzone od maja do sierpnia.

W celu bliższego zbadania wpływu czynników zewnętrznych na rozwój *TMV* na pomidorach zamierzamy przeprowadzić przyszłe nasze doświadczenia możliwie wcześnie wiosną, w lecie i w jesieni, kładąc nacisk przede wszystkim na obserwację zmian biochemicznych w roślinie pod wpływem wirusa *TMV*.

LITERATURA

Bawden F. C., 1950: Plant viruses and virus diseases. Waltham, Mass., USA.
Samuel G., 1934: według Bawdena 1950.
Siemaszko J., 1957: Obecny stan badań nad wirusami i chorobami wirusowymi ziemniaka. *Biuletyn I.H.A.R.*, **18** : 39.
Watson M. A. and Watson D. J., 1951: The effect of infection with beet yellows and beet mosaic viruses on the carbohydrate content of sugar-beet leaves, and on translocation. *Ann. Appl. Biol.*, **38** : 276.

SPIS TREŚCI — CONTENTS

Str. Page

1. J. Kwapiński: Swoiste enzymy przeciwantybiotyczne
Specific enzymic inactivations of antibiotics (Review) 181
2. L. Lepszowa i Z. Lepszy: Zastosowanie teorii elektroforezy mikroskopowej Smoluchowskiego w mikrobiologii. Cz. I. Wstęp teoretyczny i rys historyczny
Microscopic electrophoresis in microbiology. P. I. A teoretical and historical review 195
3. M. Decowski i T. Sozański: Wytwarzanie hialuronidazy przez włoskowiec różycy. I. Występowanie
Production of hyaluronidase by *Erysipelothrix rhusiopathiae* 201
4. J. Kamiński: Wpływ składników podłoża na oznaczanie drobnoustrojów w mleku
The influence of medium on viable count in microbiological examination of milk 209
5. J. Parnas i T. Mierzejewski: Wyniki badań biochemicznych i immunobiologicznych nad *Brucella brucei*
Some biochemical and immunobiological studies on *Brucella brucei* . . 221
6. J. Duda: Wpływ środków owadobójczych *HCH* i *Chlordanu* na mikroflorę gleby
Effect of insecticides *HCH* and *Chlordan* on soil microflora 237

Krótkie komunikaty:

7. Z. Rębowska: Wstępne badania nad wirusem mozaiki tytoniowej (*TMV*) na pomidorach
Preliminary studies on *TMV* in tomato plants 245

Cena zł 25.—

Warunki prenumeraty

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

Cena w prenumeracie zł 100 rocznie, zł 50 półrocznie. Zamówienia i wpłaty przyjmują:

1. Przedsiębiorstwo Upowszechnienia Prasy i Książki „Ruch", Wrocław, ul. Oławska 10/11, konto PKO nr 8-6-13768.

2. Urzędy pocztowe.

Prenumerata ze zleceniem wysyłki za granicę — 40% drożej. Zamówienia dla zagranicy przyjmuje Przedsiębiorstwo Kolportażu Wydawnictw Zagranicznych „Ruch", Warszawa, ul. Wilcza 46, konto PKO nr 1-6-100024. Bieżące numery do nabycia w księgarniach naukowych „Domu Książki" i we Wzorcowni PWN, Warszawa, ul. Miodowa 10.

Informacji w sprawie sprzedaży egzemplarzy z poprzednich lat udziela Centrala Kolportażu „Ruch", Sprzedaż Prasy Zdeaktualizowanej, Warszawa, ul. Srebrna 12, oraz Wzorcownia PWN, Warszawa, ul. Miodowa 10.